



# Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

**“Evaluación antioxidante y antimicrobiana de metabolitos secundarios de *árnica Montana* y *árnica mexicana*”**

Para obtener el título de:

**Licenciado en Químico Farmacobiólogo**

Presenta:

**Sandoval Palacios Javier**

Director de Tesis:

**Dr. Alan Carrasco Carballo**

Asesores de Tesis:

**M. en C. Itzel Paulina Morales Sandoval**

**Dr. Jesús Sandoval Ramírez**

Febrero 2024





El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Síntesis y Elucidación en Química Orgánica, en las divisiones de Productos Naturales, Antioxidantes y Microbiología bajo la dirección del Dr. Alan Carrasco Carballo, M. en C. Itzel Paulina Morales Sandoval y el Dr. Jesús Sandoval Ramírez.

## Permiso de Impresión



OFICIO C.Q./CT 058A/2023

**Dr. Jorge R. Cerna Cortez**  
**Director Facultad de Ciencias Químicas**  
**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis del alumno de la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

**Javier Sandoval Palacios**

comunican a Usted la autorización para la publicación del trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez, Dr. Alan Carrasco Carballo y de la M. en C. Itzel Paulina Morales Sandoval, con el siguiente título:

**“Evaluación antioxidante y antimicrobiana de metabolitos secundarios de arnica montana y arnica mexicana ”**

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan el día 7 de diciembre de 2023.

Atentamente

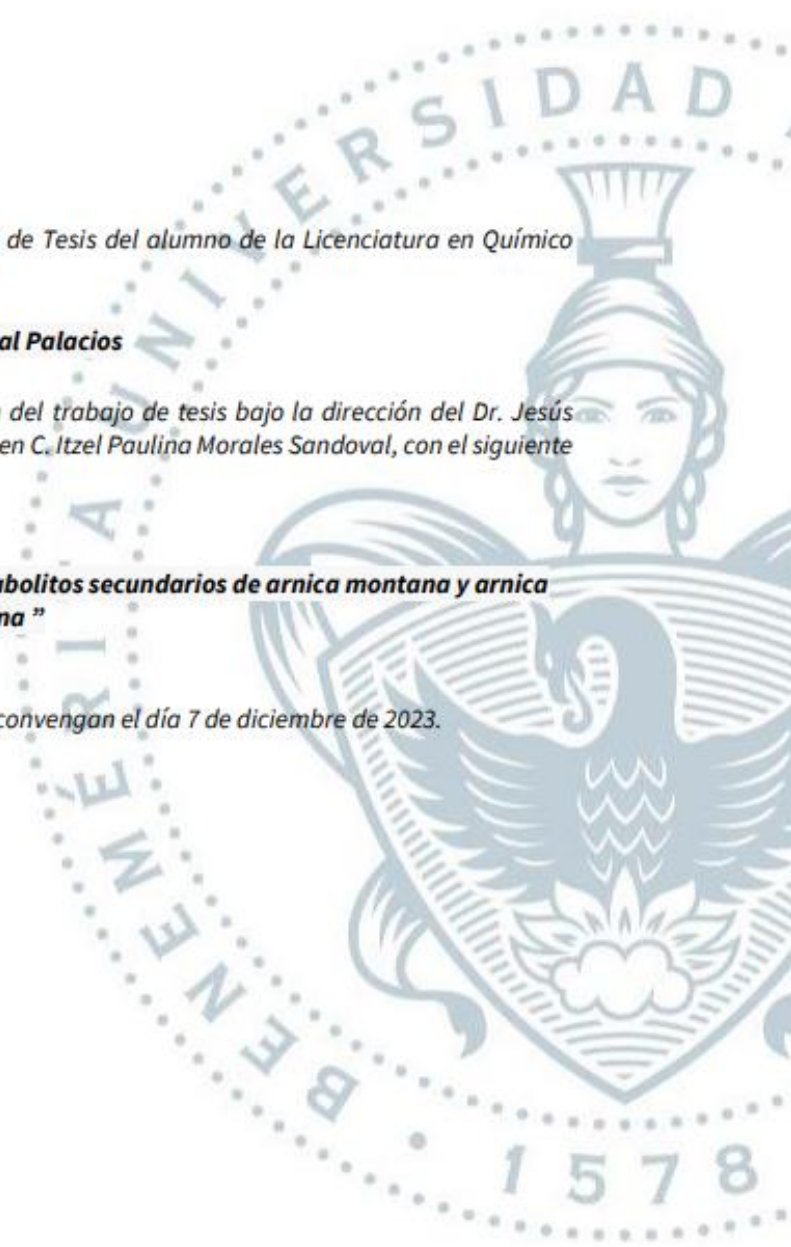
“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., a 8 de diciembre de 2023

**Dra. Ivonne Pérez Xochipa, Presidente**

**Dr. David Miguel Aparicio Solano, Secretario**

**M. en C. Arturo Parra Suárez, Vocal**



## **Agradecimientos y Dedicatorias**

Esta tesis va dedicada principalmente a todos aquellos que estuvieron conmigo en el camino apoyándome y siempre animándome a lograrlo todo, especialmente a mi madre, que en todo momento confió en mí y me apoyó en todo lo que necesité en la carrera, a pesar de varios regaños y trabas, logró hacerme un mejor estudiante, aún más que muchos maestros de la carrera, que gracias a todos sus consejos y críticas soy quien soy y llegaré a ser aún mejor gracias a ella. A mi padre que al igual que mi mamá, también me dio todo lo que necesité, de él aprendí a nunca bajar los brazos y seguir adelante, que lo que me proponga, por más mínimo que sea, lo puedo lograr sin importar nada, a mis amigos leales que en todo momento estuvieron conmigo, dando una palabra de aliento, pero sobre todo, quiero dedicar mi trabajo a mi hermana Estephany, que ella fue la principal persona por la que me motivé a darlo todo en mi carrera, que así me cayera las veces que sea siempre tuve la resiliencia suficiente para levantarme y seguir adelante, que aún con las dificultades que se le presentaron a ella también en su respectiva carrera, yo logré también salir de ellas para ser un profesionista como ella.

Agradezco a todo el apoyo del grupo LESQO, a mi profesora Teresa Pacheco que, aunque no fue mi maestra como tal en la carrera, fue la única profesora que me apoyó bastante en la última etapa de mi carrera, orientándome, aconsejándome y enseñándome cosas que me servirían en el ámbito académico y laboral.

## Resumen

El árnica es una planta muy conocida a nivel mundial, ya que es una planta que se utiliza en la medicina tradicional para tratar enfermedades y disminuir la inflamación de heridas en la piel principalmente, aliviar contusiones, esguinces o problemas reumáticos. Para este estudio se realizó la evaluación fitoquímica de árnica mexicana y Montana para compararlas entre sí, e identificar que metabolitos secundarios se encuentran en cada una de ellas, ya que pueden contener compuestos orgánicos como los polifenoles, tales como los flavonoides, se pueden hallar terpenos (triterpenos), fenoles como los oxidrilos fenólicos, u otros compuestos orgánicos como las cumarinas o lactonas, donde todos, tienen una gran variedad de propiedades fisiológicas en el organismo, como quimioprotectores, anticancerígenos, anticonvulsivantes, anticoagulantes, estimuladores de células inmunitarias como los neutrófilos y al mismo tiempo comportarse como antiinflamatorios, además de tener propiedades antibacterianas.

Así mismo, se obtuvieron 8 extractos tanto de árnica mexicana como de árnica Montana por medio de una extracción Soxhlet, donde cada extracción se realizó con un disolvente con diferente polaridad y consiguientemente se realizó un concentrado en un rotavapor de cada uno de los extractos obtenidos, con el fin de poder hacer evaluaciones posteriores en cuanto a la captación de radicales libres y el porcentaje de inhibición frente a agentes oxidantes de cada uno de los extractos obtenidos, además también se evaluó la concentración de compuestos fenólicos para determinar la capacidad antioxidante de cada planta y saber cuál es mejor en base a los extractos utilizados. Según la evaluación realizada y de acuerdo con los datos obtenidos, se realizó una prueba estadística mediante el método de Tukey con una ANOVA, para realizar agrupaciones de las medias de los extractos y determinar las diferencias significativas que tienen cada grupo y al mismo tiempo saber cuáles extractos son iguales o diferentes, estadísticamente hablando.

Finalmente se realizó la evaluación antibacteriana de extractos de cada planta, para determinar si tienen propiedades para inhibir el crecimiento de bacterias que intervienen en patologías relacionadas con trastornos de la piel principalmente. De igual manera, se utilizó el método de Tukey para estudiar cada cepa bacteriana y saber de qué planta provienen los extractos que tienen propiedades antimicrobianas, para que, con ello, se pueda concluir que planta es mejor y utilizarse para fines médicos o farmacéuticos.

# ÍNDICE

1. ANTECEDENTES .....	7
1.1. PLANTAS MEDICINALES EN EL MUNDO.....	7
1.1.1. Asteraceae.....	9
1.1.2. Anacyclus pyrethrum.....	9
1.1.3. Artemisia.....	10
1.2. PLANTAS EN MÉXICO.....	11
1.2.1. Medicina tradicional mexicana.....	12
1.2.2. Galphimia glauca.....	13
1.2.3. Aristoloquiácea elegans.....	14
1.2.4. Propiedades de Prosthechea karwinskii.....	14
1.3. ÁRNICA MONTANA.....	16
1.3.1. Características.....	16
1.3.2. Componentes.....	17
1.3.3. Efectos de Árnica montana.....	19
1.4. ÁRNICA MEXICANA.....	20
1.4.1. Características.....	20
1.4.2. Usos medicinales.....	22
1.4.3. Constituyentes químicos de árnica mexicana.....	22
1.4.4. Actividad biológica.....	24
1.5. BACTERIAS DE INTERÉS.....	25
1.5.1. Infecciones nosocomiales causadas por Acinetobacter baumannii.....	26
1.5.2. Actividades antimicrobianas contra P. aeruginosa en infecciones de piel.....	27
1.5.3. Sepsis rápida por bacteriemia por P. fluorescens y P. putida.....	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. METODOLOGÍA.....	32
3.1 PRUEBAS FITOQUÍMICAS.....	32
3.1.1. Esteroides y terpenos (Lieberman-Burchard).....	32
3.1.2. Prueba de Shinoda.....	33
3.1.3. Prueba de Salkowsky (identificación de esteroides y de flavonas).....	33
3.1.4. Prueba de oxidrilos fenólicos, fenoles (CuSO <sub>4</sub> al 5%).....	33
3.1.5. Insaturaciones- Prueba del KMnO <sub>4</sub> (al 2% en agua).....	34
3.1.6. Prueba de Molish- para azúcares.....	34
3.1.7. Para cumarinas- prueba de NaOH (10%, m/v en agua).....	34
3.1.8. Para lactonas- prueba de KOH (10%, m/v en etanol).....	35
3.1.9. Prueba de saponinas (test de la espuma).....	35
3.1.10. Prueba de identificación de antocianinas.....	35
3.1.11. Prueba de identificación de grupo carbonilo (fenilhidrazina/etanol).....	36
3.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	36
3.3 ENSAYO DPPH.....	38
3.4 ENSAYO FOLIN-CIOCALTEU.....	44
3.5 EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	46
3.5.1 Medios de cultivo.....	47
3.5.2 Siembra y colocación de extractos de ambas árnicas.....	48
3.6 MÉTODO DE TUKEY.....	50
3.7 DIAGRAMA DE BLOQUES.....	50
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	51

4.1 PRUEBAS FITOQUÍMICAS.....	51
4.1.1. Esteroides y terpenos (Lieberman-Burchard).....	51
4.1.2. Prueba de Shinoda.....	52
4.1.3. Prueba de Salkowsky (identificación de esteroides y de flavonas).....	52
4.1.4. Prueba de oxidrilos fenólicos, fenoles (CuSO <sub>4</sub> al 5%).....	53
4.1.5. Insaturaciones- Prueba del KMnO <sub>4</sub> (al 2% en agua) EN PLACA DE PORCELANA.....	53
4.1.6. Prueba de Molish.....	53
4.1.7. Para cumarinas- prueba de NaOH (10%, m/v en agua).....	53
4.1.8. Para lactonas- prueba de KOH (10%, m/v en etanol).....	54
4.1.9. Prueba de Saponinas (Test de espuma).....	55
4.1.10. Prueba de identificación de antocianinas.....	55
4.1.11. Prueba de identificación de Grupo carbonilo.....	55
4.1.12. Resultados pruebas fitoquímicas:.....	56
4.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	57
4.2.1. Cuantificación de extractos de árnica mexicana y Montana:.....	57
4.3 ENSAYO DPPH.....	59
4.3.1. Resultados DPPH.....	59
4.3.2. DPPH Árnica Mexicana.....	61
4.3.3. DPPH Montana.....	62
4.4 ENSAYO FOLIN-CIOCALTEU.....	63
4.4.1. Resultados Ensayo Folin-Ciocalteu:.....	63
4.4.2. Folin A mexicana.....	64
4.4.3. Folin A Montana.....	65
4.5 EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	65
4.5.1. Resultados de Evaluación Antimicrobiana.....	65
5. CONCLUSIÓN.....	76
6. REFERENCIAS.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Achillea biebersteinii</i> afan.....	9
Figura 2. <i>Anacyclus pyrethrum</i> .....	10
Figura 3. <i>Artemisia absinthium</i> .....	11
Figura 4. <i>Artemisia campestris</i> .....	11
Figura 5. Valor de uso de plantas medicinales en México .....	12
Figura 6. <i>G. Glauca</i> .....	14
Figura 7. <i>Prosthechea karwinskii</i> del sureste de México .....	15
Figura 8. <i>Árnica montana</i> .....	17
Figura 9. Estructura flavonoide figura.....	18
Figura 10. Estructura ácido fenólico.....	19
Figura 11. Estructura sesquiterpenos .....	19
Figura 12. <i>Heterotheca inuloides</i> : a) planta y b) flor. Se distinguen las flores discales y liguladas, y las hojas y tallos pubescentes con finos pelos.....	21
Figura 13. Sesquiterpenos .....	23
Figura 14. Polifenoles totales .....	23
Figura 15. Triterpenos .....	23
Figura 16. Compuestos orgánicos .....	23
Figura 17. Hemorragia lateral de pierna derecha.....	29
Figura 18. Cantidad aproximada de muestra de <i>árnica</i> para cada planta .....	32
Figura 19. Planta seca de <i>árnica</i> mexicana (hojas/flor) .....	37
Figura 20. Sistema de extracción soxhlet .....	37
Figura 21. Mecanismo de acción del reactivo folin-ciocalteu .....	45
Figura 22. Ensayo folin-ciocalteu por triplicado .....	46
Figura 23. Tubos eppendorf con proliferación bacteriana (se muestra turbidez).....	48
Figura 24. Colocación de círculos de papel filtro en cada placa de manera simétrica y al centro el antibiótico control de ácido clavulánico-amoxicilina. ....	49
Figura 25. Inyección de 100 µl cada uno de los extractos de su previa solución madre .....	49
Figura 26. Diagrama de bloques de la metodología utilizada.....	50
Figura 27. Prueba esteroides y terpenos negativa para <i>árnica montana</i> .....	51
Figura 28. Prueba shinoda negativa para ambas plantas .....	52
Figura 29. Flavonoles positivos en ambas plantas (+++) .....	52
Figura 30. Insaturaciones (++) en ambas <i>árnicas</i> , oxidrilos (+) en <i>árnica mexicana</i> .....	53
Figura 31. Cumarinas positivas en <i>árnica montana</i> .....	54
Figura 32. Lactonas positivas en <i>árnica montana</i> .....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados por triplicado de pruebas fitoquímicas del árnica mexicana y montana.....	56
Tabla 2. Pesos totales de extractos de árnica mexicana y volúmenes de solución madre.....	58
Tabla 3. Pesos totales de extractos de árnica montana y volúmenes de solución madre.....	59
Tabla 4. Resultados por triplicado del ensayo dpph de las 8 muestras correspondientes a las extracciones realizadas del árnica mexicana.....	60
Tabla 5. Resultados por triplicado del ensayo dpph de las 8 muestras correspondientes a las extracciones realizadas del árnica montana.....	60
Tabla 6. Agrupaciones por método de tukey para dpph para a. Mexicana.....	61
Tabla 7. Agrupaciones por método de tukey para dpph para a. Montana.....	62
Tabla 8. Resultados por triplicado del ensayo folin-ciocalteu de las 8 muestras correspondientes a las extracciones realizadas de árnica mexicana.....	63
Tabla 9. Resultados por triplicado del ensayo folin-ciocalteu de las 8 muestras correspondientes a las extracciones realizadas de árnica montana.....	63
Tabla 10. Agrupaciones por método de tukey de folin para a. Mexicana.....	64
Tabla 11. Agrupaciones por método de tukey de folin para a. Montana.....	65
Tabla 12. Agrupaciones por método de tukey de la evaluación antimicrobiana de e. Faecalis para a. Mexicana.....	65
Tabla 13. Agrupaciones por método de tukey de la evaluación antimicrobiana de e. Coli para a. Mexicana.....	67
Tabla 14. Agrupaciones por método de tukey de la evaluación antimicrobiana de p. Fluorescens para a. Mexicana.....	68
Tabla 15. Agrupaciones por método de tukey de la evaluación antimicrobiana de a. Baumannii para a. Mexicana.....	69
Tabla 16. Agrupaciones por método de tukey de la evaluación antimicrobiana de p. Aeruginosa para a. Mexicana.....	70
Tabla 17. Medición de halos de inhibición de árnica mexicana.....	71
Tabla 18. Agrupaciones por método de tukey de la evaluación antimicrobiana de e. Faecalis para a. Montana.....	71
Tabla 19. Agrupaciones por método de tukey de la evaluación antimicrobiana de e. Coli para a. Montana.....	72
Tabla 20. Agrupaciones por método de tukey de la evaluación antimicrobiana de p. Fluorescens para a. Montana.....	73
Tabla 21. Agrupaciones por método de tukey de la evaluación antimicrobiana de a. Baumannii para a. Montana.....	73
Tabla 22. Agrupaciones por método de tukey de la evaluación antimicrobiana de p. Aeruginosa para a. Montana.....	74
Tabla 23. Medición de halos de inhibición de árnica montana.....	75

## ÍNDICE DE FÓRMULAS

Fórmula 1. Cálculo de porcentaje de inhibición .....	44
Fórmula 2. Cálculo de absorbancia real .....	46

## **1. Antecedentes**

### **1.1. Plantas medicinales en el Mundo**

El uso común de la medicina tradicional, tanto en humanos como en animales, ha sido bien documentada, dado que es común la utilización de esta, para tratar los problemas de salud cotidianos, especialmente en pueblos indígenas de todo el mundo, y dicha medicina tradicional está especialmente constituida por plantas medicinales, de las cuales, la mayoría son ampliamente utilizadas para la formulación de fármacos, lo que ha llevado a su estudio y conservación, sin embargo, esta se ha visto afectada por el aumento comercial de materia prima que se obtiene de la naturaleza. Por ejemplo, estudios comprueban que en el continente africano se encuentran una gran cantidad de plantas medicinales que aún no han sido descubiertas, pero debido a la alta demanda de tala de árboles, ha provocado la pérdida de dichas plantas para uso medicinal. De igual manera, en Etiopía, se realizan diversas prácticas culturales en la agricultura, pero existen muy pocos estudios etnobotánicos dada la alta prevalencia y diversidad de grupos étnicos existentes en el país que han impedido esto. (Asfaw et al., 2023)

Se ha demostrado que extractos de plantas medicinales logran ser buenas alternativas para tratar diversos padecimientos comunes en la población, desde contusiones, dolor de cabeza, problemas de ansiedad, estrés, obesidad, enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, diabetes, etcétera, de los cuales se pueden mencionar de frijol blanco, yerba Mate, o extractos de hoja de té verde, por mencionar algunos ejemplos, que principalmente intervienen positivamente en el control de la ganancia de peso, interactúan de mejor manera en comparación con un placebo, intervienen en la propulsión intestinal, disminuir el estrés oxidativo y la inflamación, así como inhibir la glicación de moléculas de azúcar con otras biomoléculas, (Aziz et al., 2023).

El extracto de Té Verde también se ha descubierto que tiene propiedades antioxidantes, ya que cuentan con vitamina C y E, las cuales ayudan a prevenir imperfecciones en la piel, también tiene propiedades antiinflamatorias, previene el envejecimiento de la piel dados los componentes que posee, (Sharma et al., 2012).

En cuanto a las propiedades antibacterianas del extracto de té verde, se ha encontrado en la literatura que un extracto acuoso proveniente de las hojas de té verde fue utilizado para evaluar la

susceptibilidad de ciertas bacterias de interés para determinar la CMI en la que se podría utilizar dicho extracto. La CMI utilizada para contrarrestar los efectos de *P. fluorescens*, *S. epidermidis* fue de 0.156 mg/ml. De esta manera, se ha documentado la actividad del extracto de té verde en la medicina tradicional, (Sharma et al., 2012).

Cabe destacar que este extracto se consume generalmente como bebida y puede llegar a tener cierto grado de toxicidad. Se ha encontrado que los flavonoides, los cuales son los metabolitos secundarios y moléculas claves de la actividad de la planta, son anticancerígenos y funcionan como componentes cardioprotectores, sin embargo, en dosis altas pueden resultar mutágenos y prooxidantes, lo cual puede generar radicales libres que llegan a afectar el metabolismo hormonal, entre otros, (Sharma et al., 2012).

De igual manera, existen plantas medicinales que intervienen en procesos de cicatrización en la piel, la cual, es el tejido más grande y extenso del cuerpo humano y es la principal barrera de los humanos contra el medio externo, y se puede ver dañada por algún traumatismo, herida o cortadura. Dentro de los principales problemas de salud que afectan al deterioro de la piel, resultan ser enfermedades comunes como diabetes o cáncer, y por ello es un tema de importancia mundial para buscar alternativas de cómo ayudar al sistema inmunológico a tratar este tipo de complicaciones, sobre todo en la cicatrización de la piel. Estudios mencionan que el autoconsumo de medicamentos antiinflamatorios como el ibuprofeno o la aspirina se asocia principalmente a un riesgo de padecer cáncer. Una herida en el proceso de inflamación agudo puede curarse en cuestión de días, sin embargo, un proceso inflamatorio crónico puede tardar semanas, meses o en casos muy extremos, años, y esto se debe a la excesiva infiltración de células proinflamatorias como los son los neutrófilos, (Mssillou et al., 2022).

Debido a este problema de carácter mundial y de gran prevalencia, los investigadores han buscado diferentes alternativas para la medicina ortodoxa, haciendo a un lado a los medicamentos de primera generación y enfocándose más hacia la medicina tradicional, involucrando a las plantas medicinales para obtener tratamientos adecuados y efectivos. En el Mediterráneo existen más de 10,000 especies de plantas medicinales y aromáticas, así como 25,000 especies nativas en dicha zona, de las cuales, no se ha hecho una investigación tan afondo. Así mismo, es importante mencionar el papel tan importante que llevan dichos compuestos de las plantas en la cicatrización, (Mssillou et al., 2022).

### 1.1.1. *Asteraceae*



*Figura 1. Achillea biebersteinii afan*

Plantas de la familia *Asteraceae* son las que comúnmente son utilizadas para remedios para el tratamiento de heridas en la piel, ya que funcionan como agentes cicatrizantes y son especialmente utilizadas en países del mediterráneo como lo son Marruecos, Argelia, Turquía, Italia y Túnez. De igual manera, muchas de estas especies pertenecientes a la familia *Asteraceae* han sido conocidas por su amplio uso en la cicatrización de heridas, por ejemplo: *Achillea biebersteinii Afan*, una planta de flores amarillas pequeñas (**Figura 4**), se utiliza para tratar dolor abdominal, heridas y dolor de estómago, además de que puede inhibir la formación de cicatrices mediante la regulación del Factor de crecimiento  $\beta 1$  y el de fibroblastos. Se ha informado que otras especies de la misma familia tienen propiedades antibacterianas, antioxidantes, de curación de heridas, antiinflamatorias y antiespasmódicas, (Mssillou et al., 2022).

### 1.1.2. *Anacyclus pyrethrum*

*Anacyclus pyrethrum*, es una planta medicinal con pétalos blancos similares a las margaritas (**Figura 5**) y es comúnmente utilizada en países como Marruecos, Argelia y España, donde se utilizan principalmente las raíces para tratar dolor muelas, problemas con la digestión, letargo y la

infertilidad, principalmente en mujeres, además, también se ha reportado que sus propiedades más importantes son como agente antimicrobiano, antiinflamatorio, antidiabético y hepatoprotector, o bien, protege a las células del hígado debido a los altos contenidos de polifenoles y flavonoides en sus raíces, (Mssillou et al., 2022).



*Figura 2. Anacyclus pyrethrum*

### 1.1.3. *Artemisia*

Existen otras dos especies del género *Artemisia* (*Artemisia absinthium* L. y *Artemisia campestris* L.; **Figuras 6 y 7**) que poseen propiedades curativas en cuanto a heridas, se utilizan principalmente en Marruecos y Argelia, además, cabe destacar que solamente se diferencian en la apariencia, ya que *A. absinthium* crece en ambientes más húmedos y su tonalidad es amarilla, por otra parte *A. campestris* crece en ambientes áridos y el brote de la flor no es muy pronunciado. Estas plantas se utilizan en la medicina ortodoxa tradicional para tratar la diabetes, la hipertensión, funciona como agente antiinflamatorio y cicatrizante de heridas en piel. Por otra parte, *A. campestris* es una hierba aromática que de igual manera se utiliza para tratar la diabetes, y funciona como antioxidante e antiinflamatorio en el norte de África, además de que son ricas en compuestos fenólicos, (Mssillou et al., 2022).



*Figura 3. Artemisia absinthium*

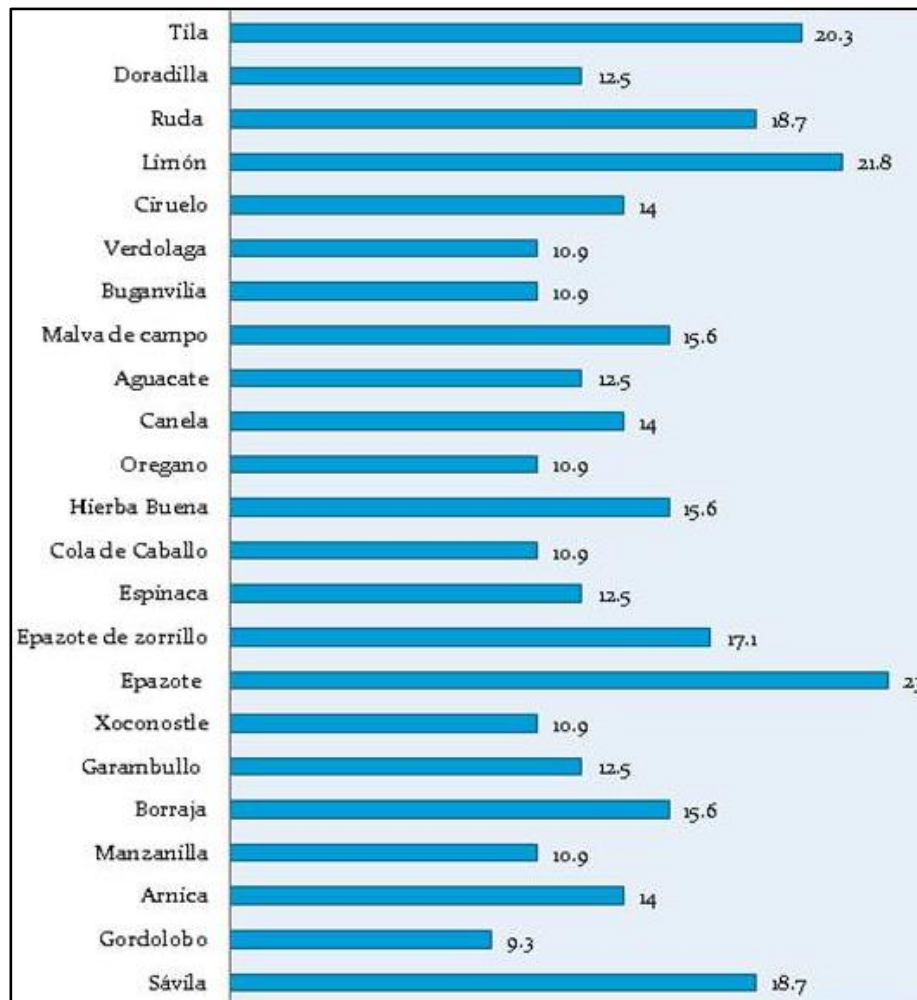


*Figura 4. Artemisia campestris*

## 1.2. Plantas en México

México es un país con una gran biodiversidad natural, se estiman 23,400 plantas vasculares, de las cuales, en su mayoría, no se tiene información detallada o mucho menos registrada en los libros de botánica en México. En la **Figura 8** se muestran las principales plantas medicinales que se comercializan alrededor de toda la república mexicana, principalmente en el estado de Hidalgo, poniendo porcentajes a cada una de las plantas, donde cada valor representa la importancia o el valor cultural y la mayoría cuenta con un valor mayor a 9. El epazote, el limón y la tila, son las principales

plantas medicinales con mayor valor cultural en México y con un 14% se encuentra el árnica. (Carrera-Fernández et al., 2023).



*Figura 5. Valor de uso de plantas medicinales en México*

### 1.2.1. Medicina tradicional mexicana

La medicina tradicional mexicana es de gran importancia y relevancia en todo el territorio mexicano, conservando así todo aquel tratamiento terapéutico no farmacológico desde hace siglos, que van desde la herbolaria utilizada por los mayas de la cual no se tiene información actualizada, la fusión de culturas con la conquista de los españoles en México, hasta la actualidad, es por ello que la

medicina tradicional mexicana es un abanico de culturas que han determinado la cultura nacional hasta nuestros días. En México es común escuchar a la comunidad que padece con alteración de los “nervios”, pero este solo es el nombre cotidiano que le establecieron a diversos padecimientos que alteran al sistema nervioso central, dónde cualquier acontecimiento o circunstancia que altere nuestro estado anímico y emocional, se considera como agente desencadenante, provocando reacciones violentas, exhaustivas, depresivas, etcétera, (Gutiérrez et al., 2014). De igual manera, la comunidad también recurre a la medicina tradicional utilizando extractos preparados en formas de cremas o infusiones, esto con el fin no solo de tratar enfermedades relacionadas con el sistema nervioso, sino también a nivel muscular o en la piel, (Carrera-Fernández et al., 2023).

Diversos grupos étnicos del estado de San Luis Potosí distinguen este tipo de enfermedades y se han basado en la medicina tradicional para tratar este tipo de enfermedades comunes en la población, basándose en la herbolaria documentada desde hace 15 años. Cotidianamente se utilizan remedios caseros como los “tes”, que en realidad son infusiones de las hojas, flores o raíces de la planta, al igual que las decocciones utilizadas por grupos rurales, (Gutiérrez et al., 2014).

### **1.2.2. *Galphimia glauca***

Esta planta se le conoce como “calderona amarilla”, “flor estrella” (**Figura 9**) entre otros nombres más y es una de las especies más estudiadas y utilizadas para tratar la excitación nerviosa y la ansiedad. Se halló que mediante la recuperación de un extracto metanólico de *G. glauca*, el cual se administró 3 veces, provocaba un efecto ansiolítico, y esto se debía a los grupos hidroxilo libres. Así mismo, de igual manera se administraron otros extractos acuosos como los etanólicos y fueron evaluados en ratones para determinar sus efectos en cuanto a sus cambios de comportamiento y si llegaban a tener alguna alteración específica o farmacotóxica, de manera que únicamente se observó el decremento de su actividad espontánea y sus análisis histopatológicos de sus órganos no mostraron algún cambio, además de que no hubo muerte de estos, (Gutiérrez et al., 2014).



*Figura 6. G. glauca*

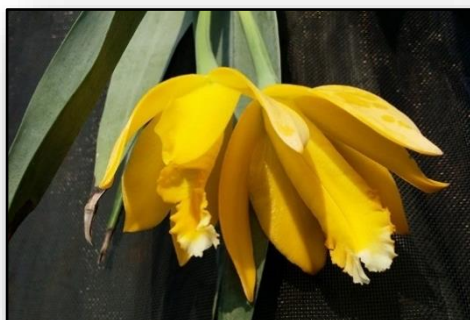
### **1.2.3. *Aristolochiácea elegans***

Podemos destacar el efecto analgésico de *Aristolochiácea elegans*, la cual contiene un alcaloide relacionado con la interacción con el receptor de acetilcolina, provocando una actividad antagonista, Asimismo, presenta actividad antiinflamatoria y antioxidante gracias a la presencia de esteroides y terpenos, además, cuenta con moléculas de vainillina, la cual sirve para inhibir la expresión de citocinas, moléculas proinflamatorias, etc, (Carrera-Fernández et al., 2023).

### **1.2.4 Propiedades de *Prosthechea karwinskii***

*Prosthechea karwinskii* es una planta medicinal endémica del sureste de México (**Figura 10**), se encuentra principalmente en el estado de Oaxaca, aunque no se tienen hallazgos de que se encuentre en algún otro estado. Esta flor es de folclor en muchos pueblos del estado, se utiliza principalmente para arreglos florares en temporada de “semana santa”, ya que es la época en la que más crece. Medicinalmente hablando, muchos curanderos la usan para tratar enfermedades de interés, utilizando ciertas partes de la planta, por ejemplo, utilizan las hojas para tratar la diabetes al igual que los pseudobulbos, pero estos últimos también se utilizan para aliviar la tos y tratar heridas y quemaduras. Por último, las flores de la planta se utilizan de igual manera para aliviar la tos y

también se utilizan como infusión para prevenir abortos y mejorar las condiciones fisiológicas de la mujer al momento del parto, (Barragán-Zarate et al., 2022).



**Figura 7. *Prosthechea karwinskii* del sureste de México**

*P. karwinskii* está relacionada con procesos inflamatorios, como la diabetes, la cual se caracteriza por un bajo grado inflamación, la tos por una inflamación de las vías respiratorias y en el parto de mujeres existe una mayor migración de células fetomaternas. Sin embargo, todas estas células proinflamatorias son una respuesta positiva del sistema inmunológico, ya que se dirigen al sitio donde sucede la lesión o daño, mientras que la actividad de la planta ayuda a aliviar los padecimientos y que la inflamación disminuya, (Barragán-Zarate et al., 2022).

Otros estudios mencionan que los extractos separados de hojas, pseudobulbos y flores de *P. karwinskii* inhiben la coagulación de la sangre *in vitro*, además de que ayudan a disminuir la glucosa, tejido adiposo, colesterol, así como la disminución significativa de resistencia a la insulina, riesgo cardiovascular y el estado proinflamatorio en ratas Wistar que padecían síndrome metabólico. El extracto de hojas contribuye a la inhibición de especies reactivas de oxígeno (ROS) y también funciona como gastroprotector. Las ROS son un producto completamente normal del metabolismo de moléculas en el organismo, sin embargo, cuando rebasa las condiciones que se encuentran dentro del rango fisiológico pueden causar estrés oxidativo, alterando diversas funciones fisiológicas en el organismo. La función farmacológica de las plantas medicinales en este tipo de casos puede estar relacionada con la eliminación de ROS y por ende el estrés oxidativo, por ello su efecto terapéutico de las plantas medicinales puede estar relacionado con la capacidad de atacar a las ROS y disminuir

el estrés oxidante, pues éste está presente en muchas enfermedades existentes, (Barragán-Zarate et al., 2022).

En cuanto el análisis fitoquímico de la planta, se reveló la presencia de metabolitos secundarios de polifenoles como flavonoides, fenoles, antraquinonas y saponinas, sin embargo, aún no se tienen hallazgos de que la actividad terapéutica es dada por dichos metabolitos, simplemente por la preparación de infusiones de *P. karwinskii*, por lo tanto, se requiere una investigación más a fondo y evaluar los extractos de la planta con un método de preparación que sea similar al de la medicina tradicional. (Barragán-Zarate et al., 2022).

### 1.3. Árnica Montana

Existen numerosas plantas medicinales en el mundo, que son utilizadas para diferentes tipos de tratamientos en la medicina tradicional, generalmente contienen ciertos metabolitos secundarios como los polifenoles, los cuales pueden tener actividad antioxidante, cicatrizante, antiinflamatoria, entre otras más propiedades terapéuticas. Para este estudio, se habla de 2 plantas de interés químico, el árnica Montana y el árnica mexicana, (Shiffman, 2012).

#### 1.3.1. Características

El árnica Montana, es un tipo de planta perenne, es decir, que llega a vivir hasta 2 años aproximadamente, caracterizada por tener hojas amarillas, tallo y hojas verdes, como se observa en la **Figura 8**. Existen al menos, 32 especies de árnica, aun contando el árnica Montana, también conocida como “azote del leopardo”, “azote de lobo”, “tabaco de montaña”, “árnica europea”, “árnica común”, “árnica de montaña”, entre otros nombres más. Dicha planta es originaria de Siberia y Europa central y tanto sus raíces y flores son utilizadas con fines medicinales, (Shiffman, 2012). A continuación, se presentan sus principales componentes de ésta última.



*Figura 8. Arnica Montana*

## **1.3.2. Componentes**

### **1.3.2.1 Sesquiterpenos, flavonoides, derivados del ácido cafeico.**

Se menciona que de esta planta se encontraron metabolitos secundarios en las cabezas de flores, los cuales correspondían a sesquiterpenos, flavonoides y derivados del ácido cafeico (ácido 1-metoxioxaloil-3,5-dicafeoilquínico), (Shiffman, 2012).

### **1.3.2.2. Lactonas sesquiterpénicas.**

Estas tienen como función la inhibición de la agregación plaquetaria que es inducida por el colágeno, tromboxanos y la secreción de 5-hidroxitriptamina. También redujeron en un 78% los grupos sulfhidrilo que se encontraban solubles en las plaquetas, (Shiffman, 2012).

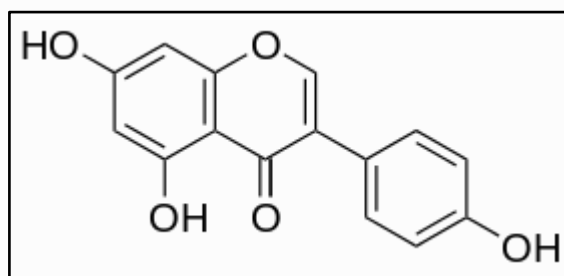
### **1.3.2.3. Glucósidos Flavonoides**

Se encontró un flavonoide metilado en 1985, el cual contribuyó en el aislamiento de 7 diferentes agliconas flavonoides. También se hallaron 6 glucósidos flavonoides que fueron encontrados a partir

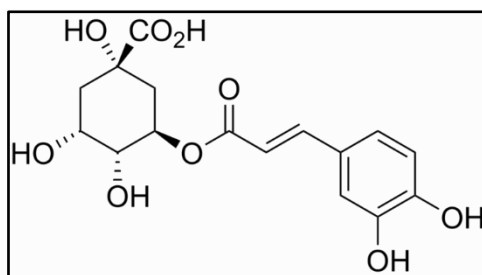
de las flores de la planta, (1. Hispidulina 7-O-beta-glucósido, 2. isorhamnetina 3-O-beta-glucósido, 3. 3-O-beta-d-glucopiranosidos de espinacetina, 4. 6-metoxikaempferol, 5. Patulina y 6. querectina), (Shiffman, 2012).

#### 1.3.2.4. Otras sustancias

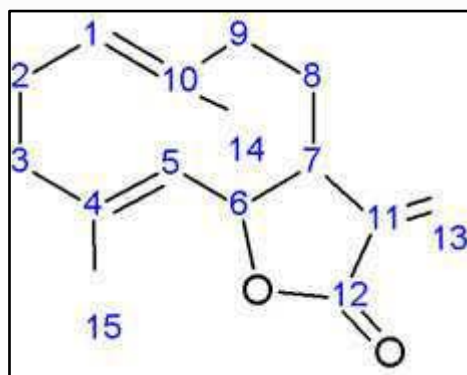
Existen otras sustancias como los flavonoides, (**Figura 9**), los cuales son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, los ácidos fenólicos, (**Figura 10**), sustancias que contienen un anillo fenólico y función orgánica de ácido carboxílico y los sesquiterpenos que son compuestos terpenoides caracterizados por tener 15 carbonos como se muestra en la **figura 11** y son moléculas que se encuentran activas en las flores de la planta, también hay presencia de ácidos grasos, donde se identificaron carotenoide. En 1984 se detectaron ésteres en los órganos verdes de la planta, helenalinas y lactonas sesquiterpénicas, estas últimas se veían afectadas en cuanto a su concentración debido a cambios en el ambiente natural. La cantidad de componentes en una planta puede variar según la madurez y el crecimiento de esta, pues se encontró que derivados de helenalina en plantas muy jóvenes de árnica y estas mismas sustancias disminuían casi a cero cuando llegaban a los 6 meses de crecimiento, por otra parte, la formación de compuestos de dihidrohelenalina incrementa proporcionalmente en el mismo periodo de tiempo y su curva de crecimiento permanece constante durante un lapso aún más prolongado, (Shiffman, 2012).



*Figura 9. Estructura Flavonoide Figura*



*Figura 10. Estructura Ácido Fenólico*



*Figura 11. Estructura sesquiterpenos*

### 1.3.3. Efectos de *Árnica montana*

El *árnica Montana* se ha aprobado que tiene diversos efectos terapéuticos, con ciertas preparaciones que se utilizaron durante siglos para tratar condiciones de la piel, en la época contemporánea se utiliza para tratar golpes, heridas, dolores musculares, cicatrización, esguinces y la inflamación, por lo que fue aprobada por la Comisión E Alemana, una institución especializada en medicina a base de plantas medicinales. También se comprobó que el *árnica Montana* intervino en la disminución significativa del tiempo de sangrado en heridas, ya que no hubo diferencia en cuanto a la equimosis durante y después de los días de tratamiento con dosis homeopáticas de la misma versus placebo, (Shiffman, 2012).

### **1.3.3.1. Efecto Antiinflamatorio**

El árnica Montana mostró un aumento de la permeabilidad vascular, el cual es inducido por la histamina en un ensayo realizado en ratas, donde un pretratamiento aplicado de la planta culminó con el bloqueo de la actividad de la histamina, (Shiffman, 2012).

### **1.3.3.2. Coagulación sanguínea**

Se encontró que el árnica Montana no tuvo un impacto significativo en la coagulación de la sangre posterior a la administración del tratamiento, (Shiffman, 2012).

### **1.3.3.3. Artrosis**

Un tratamiento muy útil para la rigidez, dolor y molestias de la osteoartritis es la aplicación tópica de gel árnica Montana durante 6 semanas, (Shiffman, 2012).

### **1.3.3.4. Sangrado posparto**

La aplicación de un tratamiento con árnica Montana demostró que puede reducir la pérdida de sangre posparto en comparación con un placebo. Sin embargo, no se recomienda utilizar un tratamiento durante el embarazo ya que en grandes dosis puede provocar un aborto espontaneo o parto prematuro, inclusive existen posibles efectos mutagénicos o secundarios si se administra en dosis altas, y esto puede conllevar a padecer inflamación en el tracto gastrointestinal, taquicardias, debilidad muscular, alteración del sistema nervioso central o incluso la muerte, (Shiffman, 2012).

## **1.4. Árnica mexicana**

### **1.4.1. Características**

Dentro de la medicina tradicional mexicana, existen más de 3 mil diferentes tipos de plantas medicinales que se utilizan como tratamiento terapéutico de diversas enfermedades. Dentro de todo este ámbito botánico existen diferentes familias de plantas que comparten el nombre de “árnica”, el cual es el nombre asociado a varias plantas utilizadas en Europa. Se han encontrado alrededor de 58

especies de plantas pertenecientes a 8 diferentes familias botánicas con el nombre de “árnica”. La familia más representativa de especies conocidas es la *Asteraceae*, comprendiendo aproximadamente 48 especies, mientras que el resto corresponde a la tribu *Astereae*, (Rodríguez-Chávez et al., 2017).



**Figura 12.** *Heterotheca inuloides*: a) Planta y b) flor. Se distinguen las flores discales y liguladas, y las hojas y tallos pubescentes con finos pelos.

Entre todas las especies existentes, *Heterotheca inuloides* (**Figura 12**), es una de las especies nativas en México más utilizadas en el País y es conocida propiamente como “árnica mexicana” desde el siglo XIX, pero igualmente es conocida con muchos otros nombres más. Dicha especie es utilizada por diversas comunidades indígenas, rurales, urbanas y semiurbanas y tras los últimos trabajos de investigación, *H. inuloides* se revisaron las propiedades medicinales, químicas y biológicas de los extractos y consiguientemente de los metabolitos secundarios de dicha planta, así como las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antinociceptivas y protectoras, demostrando sus beneficios terapéuticos, ecológicos y agronómicos, (Rodríguez-Chávez et al., 2017).

### 1.4.2. Usos medicinales

Actualmente, para tratar malestares como contusiones, reumatismo, úlceras gástricas, etc. *H. inuloides* tradicionalmente se prepara como infusiones y decocciones, ya sea solos o en combinación con otras hierbas para aliviar algún otro proceso inflamatorio actuando de manera sinérgica. También se utiliza para el tratamiento de trastornos gastrointestinales como la gastritis, dolor de estómago, úlceras y diarrea, para tratar problemas en la piel como inflamaciones tópicas, el acné, quemadura, infecciones causadas por picaduras de insectos, se utiliza de igual manera para tratar la fiebre, enfermedades pulmonares, renales, del tracto urinario, tos, padecimientos dentales, infecciones vaginales, etcétera, (Rodríguez-Chávez et al., 2017).

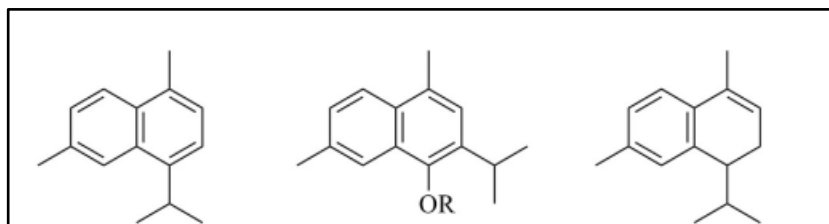
Además, se ha utilizado para tratar enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes principalmente y el cáncer, las cuales son enfermedades que padecen millones de personas en el mundo. Esta planta es utilizada en la veterinaria, principalmente en la ganadería para el curar y desinfectar heridas en animales de granja en muchas regiones de México, (Rodríguez-Chávez et al., 2017).

### 1.4.3. Constituyentes químicos de *árnica mexicana*.

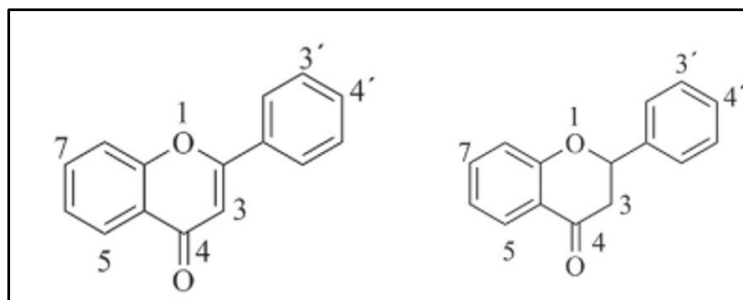
*H. inuloides* es una fuente rica en compuestos químicos con naturaleza similar, obtenidos de aceite esencial y de extractos de la planta, incluyendo raíces y flores, no únicamente de las hojas. Dichos compuestos presentan diferentes estructuras químicas, pero similares al mismo tiempo y se obtuvieron a través de diversas técnicas como cromatografía en columna abierta o Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (por sus siglas en inglés: HPLC). A continuación, se enlistan los compuestos más comunes y encontrados en los extractos de *H. inuloides*:

- ✓ Compuestos sesquiterpénicos, **(Figura 13)**.
- ✓ Polifenoles totales detectados en infusiones y extractos comerciales de *H. inuloides* mediante el ensayo Folin-Ciocalteu y compuestos fenólicos individuales detectados por técnicas espectrofotométricas y cromatográficas, **(Figura 14)**.
- ✓ Triterpenos, **(Figura 15)**.

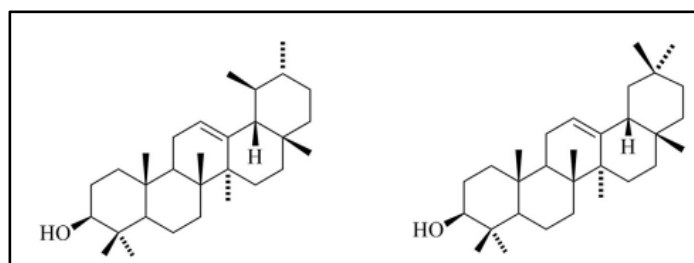
- ✓ Compuestos orgánicos mediante cromatografía de gases debido a sus características volátiles, (**Figura 16**), (Rodríguez-Chávez et al., 2017).



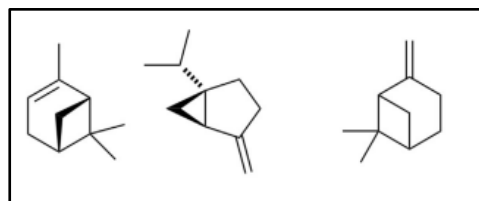
*Figura 13. Sesquiterpenos*



*Figura 14. Polifenoles totales*



*Figura 15. Triterpenos*



*Figura 16. Compuestos orgánicos*

#### 1.4.4. Actividad biológica

##### 1.4.4.1 Actividad antimicrobiana

La capacidad antimicrobiana de *H. inuloides* fue evaluada mediante ciertas cepas de interés clínico, principalmente de *Helicobacter pylori*, de la cual, el extracto metanólico mostró mejores resultados, ya que su actividad se evaluó mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), teniendo un valor significativamente mejor, siendo más bajo que el del fármaco metronidazol, pero mayor en comparación al de la amoxicilina, (Rodríguez-Chávez et al., 2017).

Extractos etanólicos y acuosos fueron evaluados contra *Streptococcus mutans* y *Phorphyromonas gingivalis*, donde ambos extractos tuvieron una actividad antimicrobiana favorable contra *S. mutans*, que, según diversos autores mencionaron que puede ser una buena alternativa debido a la potencia antimicrobiana que presentó, sin embargo, esta fue menor que los fármacos de referencia utilizados, los cuales fueron gluconato de clorhexidina y sanguinarine. La evaluación antimicrobiana del extracto etanólico no mostró actividad contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus*, (Rodríguez-Chávez et al., 2017).

La actividad antimicrobiana de extractos de diclorometano y metanol tuvieron resultados antifúngicos al evaluarse contra *Microsporum gypseum* y *Trichophyton mentagrophytes*, por otra parte, se utilizaron fármacos como la nistatina y la anfotericina, donde se necesitó una concentración 250 y 500 veces aproximadamente de los hongos respectivamente para producir un efecto similar al de los fármacos de referencia. Además, se demostró que metabolitos de sesquiterpenos presentan actividad antimicrobiana evaluando sus MIC contra *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *S. aureus* ATCC 33591, *Propionibacterium acnes* y *Trichophyton mentagrophytes*, pero no mostraron actividad antimicrobiana frente a bacterias gram negativas, (Rodríguez-Chávez et al., 2017).

Por otra parte, *H. inuloides* también presenta actividad antiparasitaria, donde se informa que mostro resultados positivos contra *Leishmania*, *Giardia intestinalis*, sin embargo, sus concentraciones fueron menos potentes y eficaces que el metronidazol, (Rodríguez-Chávez et al., 2017).

#### **1.4.4.2. Actividad antioxidante y efectos protectores**

Flavonoides como el kaempferol y la quercetina mostraron una inhibición importante en la peroxidación lipídica microsomal, donde inhiben la autooxidación de lípidos y la peroxidación lipídica mitocondrial, además de proteger a los glóbulos rojos contra la hemólisis oxidativa, (Rodríguez-Chávez et al., 2017).

Mediante un pretratamiento de extractos de *H. inuloides* o quercetina, en un modelo de hepatotoxicidad, se demostraron que protegieron al hígado contra la peroxidación lipídica como en el caso anterior y se mantuvo la actividad antioxidante para disminuir el aumento de la actividad del aspartato aminotransferasa (AST), la alanina aminotransferasa (ALT), el aumento de la fosfatasa alcalina, bilirrubina total, la creatinina y la creatina quinasa. También impidió el aumento de marcadores de estrés oxidante y el decremento de  $\gamma$ -globulina, albúmina y enzimas desintoxicantes, (Rodríguez-Chávez et al., 2017).

#### **1.5. Bacterias de interés**

Dirigiéndonos más al ámbito microbiológico, también existen microorganismos como las bacterias que tiene un impacto importante en el desarrollo de enfermedades, particularmente hablando de bacterias que pueden interaccionar con la piel, causando infecciones, contagiar heridas y provocar inflamación en músculos y tejidos blandos. Muchas de estas bacterias son susceptibles a antibióticos y se pueden tratar con un tratamiento adecuado, sin embargo, existen bacterias que logran ser resistentes a algunos fármacos y esto se debe a la resistencia antimicrobiana que se ha ido desarrollando a lo largo de los años en la sociedad. La mayoría de la población, no solo mexicana, sino en todo el mundo, no tienen una cultura y educación farmacológica en cuanto a la automedicación que constantemente se suscita y por ello al auto recetarse fármacos, sin saber las dosis, los tiempos, el efecto y fármaco adecuado de acuerdo con su padecimiento o patología, los microorganismos han ido desarrollando mayor inmunidad y resistencia a los medicamentos en general. Existen bacterias que pueden inhibir enzimas provenientes de los antibióticos y por lo tanto inhibir su efecto terapéutico, (Hiraki et al., 2013).

### 1.5.1 Infecciones nosocomiales causadas por *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* es una de las bacterias más importantes a nivel mundial y es causante de muchas infecciones y enfermedades nosocomiales, es decir, que son adquiridas por el paciente al momento de ingresar a una instalación médica, esto tomando en cuenta que se suscita antes del periodo de incubación del microorganismo o antes del periodo de ingreso del paciente. Dicha bacteria es causante de enfermedades en centros de salud como neumonía, meningitis, bacteriemia, infecciones en el tracto urinario e infecciones en la piel y tejidos blandos. Comúnmente el tratamiento para infecciones causadas por *A. baumannii* se utilizan los carbapenemes como el meropenem, sin embargo, en los últimos años, los brotes de enfermedades causados por *A. baumannii* en instalaciones médicas han aumentado de manera importante debido a la resistencia que han presentado ante los carbapenemes, especialmente mediada por las  $\beta$ -lactamasas de clase D y las metalo- $\beta$ -lactamasas de clase B, (Hiraki et al., 2013).

Se ha demostrado que en condiciones *in vitro* y mediante la combinación de antimicrobianos, se ha logrado tratar los padecimientos que causa *A. baumannii*, sin embargo, existen datos limitados en cuanto al uso eficaz de estos agentes en modelos animales resistentes a carbapenémicos, además, no hay ningún ensayo clínico documentado que valide algún tratamiento eficaz contra *A. baumannii* y es por ello que los médicos y farmacéuticos han propuesto la combinación de fármacos para que trabajen de manera sinérgica en un futuro tratamiento, (Hiraki et al., 2013).

#### Caso clínico:

Una paciente japonesa de 45 años ingresó a un centro de salud en el área de urgencias con compresión vertebral, fracturas rotulianas y heridas severas. Realizando un exudado de herida se detectó la presencia de *Staphylococcus aureus* y se trató con vancomicina (20 mg/kg/día) para prevenir la infección. A los 3 días del tratamiento no hubo presencia de *S. aureus*. Dentro de su diagnóstico la proteína C reactiva se encontraba muy elevada, la cual indicaba inflamación y de igual manera presentaba leucocitosis que es otro agente desencadenante de la inflamación. A los 3 días de tratamiento se detectó la presencia de *A. baumannii*, donde los ensayos de susceptibilidad a los antimicrobianos presentaron la resistencia a todos ellos, con excepción ampicilina-sulbactam y

colistina. Se realizó una terapia combinada de ampicilina-sulbactam (ampicilina 80 mg/kg/día y sulbactam 40 mg/kg/día) y meropenem (30 mg/kg/día) con dosis divididas 3 veces al día. Dos días después se hallaron mejorías con la PCR y el recuento de leucocitos disminuyó considerablemente, sin embargo, no hubo mejorías en cuanto al estado de la herida. Por lo tanto, se sugirió realizar la terapia combinada de ampicilina-sulbactam y colistina de manera continua y completa por 45 días para prevenir que la infección siguiera aumentando y no se administró ningún otro antibiótico. Con el paso de los días no hubo ninguna otra complicación, la herida sanó y 52 días después de que se completó el tratamiento de 45 días el paciente fue dado de alta. Un mes después ya no existía la presencia de *A. baumannii* en la herida del paciente. (Hiraki et al., 2013).

### **1.5.2. Actividades antimicrobianas contra *P. aeruginosa* en infecciones de piel.**

Dentro de las principales infecciones nosocomiales, las infecciones de piel y tejidos blandos son las más comunes, ya que normalmente suceden a causa de una mala higiene del material utilizado dentro de los centros de salud, ambiente contaminado o el arrastre de microorganismos por el personal de salud que funcionan como vehículos de infecciones. Generalmente los pacientes que llegan con infecciones graves o con un mal tratamiento de esta a pesar de la terapia antibiótica, normalmente se les da un tratamiento más agresivo, y este depende de 3 factores importantes, como lo es una buena tinción de gram a la hora de identificar de que bacteria se trata, un cultivo ideal del microorganismo y el más importante, la susceptibilidad que llegue a presentar el microorganismo frente a las pruebas antimicrobianas, (Sader et al., 2021).

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gram negativa de tipo oportunista, la cual se presenta comúnmente en infecciones de piel en los centros de salud, y dada su poca susceptibilidad y su alta resistencia a la mayoría de antimicrobianos, es un reto muy grande para la investigación, tomando en cuenta que debido a la falta de fármacos esenciales contra gram-negativos para el tratamiento de infecciones bacterianas y como se ha ido informando anteriormente, se ha optado por el desarrollo de combinaciones de  $\beta$ -Lactámicos e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas. Ésta última es una enzima que se encuentra en las bacterias y es principalmente utilizada como mecanismo de defensa contra diversos antibióticos, (Sader et al., 2021).

En un estudio publicado en 2020, se realizaron 3228 aislados bacterianos en todo el mundo, de los cuales, 350 fueron de *P. aeruginosa* en 47 distintos centros de salud en Europa, regiones de Asia, el

pacífico y América latina incluyendo a México. A todos estos aislados se les realizó una prueba de susceptibilidad utilizando el método de microdilución para lograr cuantificar la MIC (Concentración Mínima Inhibitoria, por sus siglas en ingles) y de igual manera aplicando una serie de combinaciones de fármacos. Ceftazidima/avibactam, ceftolozano/tazobactam, imipenem/relebactam y piperacilina/tazobactam se probaron con un inhibidor de la enzima  $\beta$ -lactamasa con una concentración de 4 mg/l y meropenem/vaborbactam se probó con vaborbactam a una concentración fija de 8 mg/L, donde posteriormente los resultados de MIC se interpretaron según los criterios preestablecidos en el método, (Sader et al., 2021)

Los resultados de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* fueron muy favorables, en general varias de las combinaciones de fármacos realizadas tuvieron una efectividad antimicrobiana mayor al 90%, destacando Ceftazidima/avibactam (98,3% susceptible), ceftolozano/tazobactam (98,6% susceptible) e imipenem/relebactam (98,3% susceptible) fueron los compuestos más activos después de la colistina (100,0% susceptible), pensando a futuro para un posterior tratamiento en los centros de salud y para la población, (Sader et al., 2021).

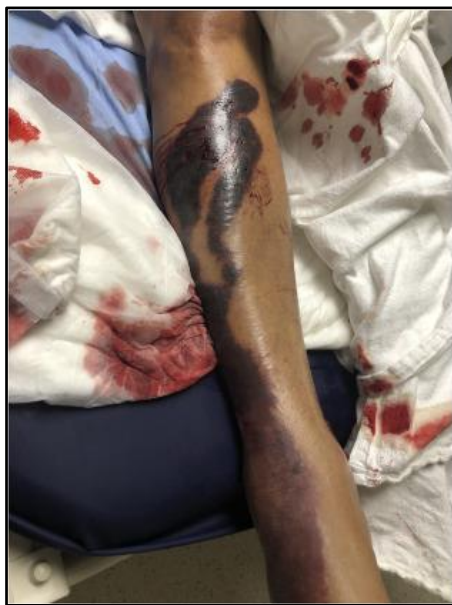
### **1.5.3. Sepsis rápida por bacteriemia por *P. fluorescens* y *P. putida***

*Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* son bacterias poco comunes en infecciones de piel y tejidos blandos, son bacilos gram negativos relacionados estrechamente con *P. aeruginosa* y al igual que esta, son microorganismos que se encuentran en todo el mundo y normalmente se encuentran en el suelo y agua. Generalmente llegan a infectar a algún paciente que sea inmunocompetente o que presente comorbilidades que conlleven al contagio de estas bacterias. Tal como se mencionó en el punto anterior, el género pseudomonas tanto *aeruginosa* como *fluorescens/putida*, suelen ser bacterias oportunistas, principalmente en infecciones nosocomiales en los centros de salud, sin embargo, estas dos últimas no presentan una virulencia alta y su mortalidad es rara, (Singh et al., 2021).

#### Caso clínico:

Una mujer se presenta al departamento de urgencias inicialmente, no tenía antecedentes familiares pertinentes y su ensayo clínico mencionaba que padecía hipertensión, hiperlipidemia y síndrome del

intestino irritable, todas estas con un tratamiento farmacológico específico. Al ingresar al hospital mencionaba que tenía dolor en el tobillo derecho 12 horas antes previo al ingreso a una piscina dentro de su lugar de residencia, 8 horas después comenzó a tener molestias en su pie derecho y mostró una hinchazón significativa, por lo que ingresó al departamento de urgencias. Dentro de su examen físico se mostró una herida equimótica de aproximadamente medía 2 cm de extensión y rango de movimiento del tobillo limitado. La paciente fue dada de alta después de recibir cuidados. Seis horas después del alta su marido y ella notaron empeoramiento de la herida, la cual comenzaba a extenderse y volviéndose más dolorosa, por lo que contactaron a servicios médicos. Sufrió un paro cardíaco debido a la insuficiencia respiratoria (hipoxia) y fue intubada en el campo, además sus signos vitales empeoraban rápidamente. Llegando al área de urgencias sus signos vitales indicaban hipotensión, dificultad para respirar y fue ventilada mecánicamente y dentro de su examen físico destacó una lesión hemorrágica en la parte lateral de su pierna desde la rodilla hasta llegar al pie **(Ver figura 17)**. Posteriormente se indicó que tuvo una falla orgánica grave, donde la respuesta fisiológica del corazón, pulmones y riñones principalmente se vieron afectados, (Singh et al., 2021).



*Figura 17. Hemorragia lateral de pierna derecha*

Se le realizaron más estudios de laboratorio, destacando una disminución significativa en los niveles de hemoglobina y se observaron niveles demasiado altos de la creatinina quinasa, la cual indica un estado de lesión muscular. Su estado de salud empeoraba, por lo que fue llevada a la unidad de cuidados intensivos para el diagnóstico específico y claro del shock séptico, además, comenzó con

la administración de líquidos de manera intravenosa. Se obtuvieron hemocultivos para antes del inicio de antibióticos intravenosos y se consultó de emergencia a cirugía general para valorar el estado de su pierna derecha. Comenzó la administración de antibióticos vía intravenosa para disminuir la fascitis necrotizante. Posteriormente el área de cirugía valoró el estado de su extremidad inferior derecha y se realizó una amputación de su extremidad por debajo de la rodilla debido al deterioro de su pierna y no se extendiera más. Posterior a la amputación se realizó un segundo conjunto de hemocultivos para bacterias, hongos y BAAR (Bacilos Ácido Alcohol-Resistente), (Singh et al., 2021).

Lamentablemente el estado de salud de la paciente empeoró y 2 días después de su ingreso al hospital falleció, sin embargo, en el estudio de los hemocultivos destacó la presencia de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* y dentro de sus pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, estos fueron sensibles a piperacilina/tazobactam, gentamicina, tobramicina y meropenem. Para este tipo de casos se llegó a determinar que el grado de agresividad del tratamiento, tanto farmacológico como físico, es la clave para un tratamiento exitoso, además de la detección temprana del agente que causa la infección. *P. fluorescens* y *P. putida* rara vez causan shock séptico, bacteriemia o muerte, generalmente la causa de estas infecciones que pueden ser de tipo nosocomiales se debe a pacientes inmunocomprometidos, pero también existen otros factores que intervienen en esto, como la administración de productos contaminados o las infecciones por catéteres, (Singh et al., 2021)

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

- Evaluar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de metabolitos secundarios obtenidos por extracción diferencial de árnica mexicana y árnica Montana.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Evaluar las propiedades fitoquímicas del árnica mexicana y árnica Montana.
- Obtener extractos de una variedad específica de árnica mexicana y árnica Montana.
- Evaluar la inhibición y captación de radicales libres, así como la cantidad de polifenoles totales de los diferentes extractos obtenidos de árnica mexicana y árnica Montana.
- Determinar la capacidad antimicrobiana de extractos de árnica mexicana y árnica Montana.

### 3. Metodología

#### 3.1 Pruebas Fitoquímicas

En primera instancia se determinó qué metabolitos secundarios están presentes en ambas plantas. Para ello, se trituró una gran cantidad de flor de árnica, hojas y tallos en un mortero de porcelana para realizar las pruebas, además, dichas pruebas se realizaron en tubos de ensaye y se determinó la cantidad aproximada de trozado que debe contener cada tubo cuando lo requiera como se muestra en la **Figura 18**, así como también se utilizó una placa de porcelana. A continuación, se enlistan cada una de las pruebas que se realizaron a las muestras de ambas árnicas.



*Figura 18. Cantidad aproximada de muestra de árnica para cada planta*

##### 3.1.1. Esteroides y terpenos (Lieberman-Burchard).

- A. Disolver una muestra lo más posible en cloroformo, considerando haber colocado alrededor de la tercera parte del tubo con muestra y el cloroformo hasta poco menos de la mitad de la altura del tubo (en caso de trozado, recubrir, agitar circularmente y dejar reposar 5 min).
- B. Añadir un ml de solución de Lieberman-Burchard.
- C. Revisar al momento y cada 5 min por media hora.
- D. Si hay cambio de coloración (parte superior).
- E. Colores azul-verde dan positivo a esteroides, mientras que colores: naranja/rojo/violeta dan positivo generalmente a triterpenos.
- F. Si no hay cambios de color, la prueba es negativa.

### **3.1.2. Prueba de Shinoda.**

- A. Colocar 1 mg de muestra (o la tercera parte del tubo) y recubrir con etanol;
- B. Dejar un par de minutos y posteriormente añadir la limadura de magnesio (un trozo del Mg en caso de contar con el reactivo en ralladura).
- C. Posteriormente añadir 3 gotas de HCl concentrado (con cuidado, despacio, por las paredes del tubo) y observar.
- D. La prueba es positiva si se observan colores naranja, rojo, rosa, rosa-azul y/o violeta.
- E. Es importante considerar tomar el registro al momento en que aparezca la coloración, pues este tiende a desaparecer rápidamente.

### **3.1.3. Prueba de Salkowsky (identificación de esteroides y de flavonas).**

- A. Añadir muestra a una tercera parte (o cuarta parte al menos) del tubo de ensaye y disolver en cloroformo (lo más posible; en caso de trozado, recubrir la muestra, agitar circularmente y dejar reposar 5 min antes de iniciar la prueba);
- B. Agregar 1 ml de ácido sulfúrico concentrado (despacio, por las paredes del tubo) y observar se hay algún cambio de coloración.
- C. Es positiva para flavonoles si la coloración es amarilla, flavonas naranja-guinda, chalconas roja-azulado y quinonas rojo-purpura.
- D. Coloraciones amarillas/anaranjadas/rojizas menos intensas pueden representar ser positivos para esteroides.

### **3.1.4. Prueba de oxidrilos fenólicos, fenoles (CuSO<sub>4</sub> al 5%).**

- A. Colocar en el tubo de ensaye la muestra (llenar la tercera parte) y recubrir con un volumen de etanol (llenando el tubo hasta la mitad).
- B. Disolver o, en caso de trozado, dejar reposar 10 min.
- C. Posteriormente, colocar parte de dicho etanol (cuidando de no añadir sólidos) en un pocillo de la placa de porcelana.
- D. Añadir de una a dos gotas del reactivo sobre el etanol colocado.

- E. Cambio de coloración (Rojo, azul fuerte, violeta, verde) y/o formación de precipitado representan un resultado positivo.

### **3.1.5. Insaturaciones- Prueba del $\text{KMnO}_4$ (al 2% en agua)**

- A. Colocar en el tubo de ensaye la muestra (llenar la tercera parte) y recubrir con un volumen de etanol (llenando el tubo hasta la mitad).
- B. Disolver o, en caso de trozado, dejar reposar 10 min.
- C. Posteriormente, colocar parte de dicho etanol (cuidando de no añadir sólidos) en un pocillo de la placa de porcelana.
- D. Añadir de una gota sobre el etanol colocado.
- E. Cambio de coloración (café) y formación de precipitado representan un resultado positivo.

### **3.1.6. Prueba de Molish- para azúcares.**

- A. Es un tubo de ensaye se coloca la muestra (hasta una cuarta parte del tubo) y añadir 3 gotas de reactivo de Molish.
- B. Agitar levemente, inclinar el tubo y añadir lentamente 1 ml de ácido sulfúrico (2ml si se trabajó con tubos de ensayo muy grandes o muestras fúngicas).
- C. Es importante añadir lentamente, pues el ácido está concentrado.
- D. La prueba es positiva si en la orilla se forma un anillo coloreado (no transparente).
- Nota: En caso de no haber reactivo, este se prepara con 1 g de  $\beta$ -naftol en 100ml de etanol al 96%.

### **3.1.7. Para cumarinas- prueba de NaOH (10%, m/v en agua).**

- A. Colocar la muestra en el tubo de ensaye (rellenar la cuarta parte) y disolver en un volumen de NaOH al 10%.
- B. En caso de no poder disolver completamente añadir el volumen de disolución recubriendo la muestra y esperar 5 min.

- C. Si se observa una coloración amarilla, continuar con el siguiente punto; si no, dar la prueba por negativa.
- D. Si hubo cambio de coloración (amarillo), acidular añadiendo 3 gotas de HCl concentrado.
- E. Si la coloración amarilla desaparece la prueba es positiva.

### **3.1.8. Para lactonas- prueba de KOH (10%, m/v en etanol).**

- A. Colocar la muestra en el tubo de ensaye (rellenar la cuarta parte) y disolver en un volumen etanol.
- B. En caso de no poder disolver completamente añadir el volumen de disolución recubriendo la muestra y esperar 5 min.
- C. Añadir posteriormente un volumen igual de KOH al 10% en etanol.
- D. Si se observa una coloración amarilla, continuar con el siguiente punto, de lo contrario, dar la prueba por negativa.
- E. Si hubo cambio de coloración (amarillo), acidular añadiendo 4 gotas de HCl concentrado.
- F. Si la coloración amarilla desaparece la prueba es positiva.

### **3.1.9. Prueba de saponinas (test de la espuma).**

- A. Colocar la muestra en el tubo de ensaye (rellenar la cuarta parte) y añadir agua caliente (al menos a 50°C).
- B. Agitar con cuidado para no regar el contenido del tubo y observar si hay o no formación de espuma.
- C. De formarse la espuma, revisar la estabilidad de esta.
- D. Si se mantiene más de 15 minutos -mantener por una hora la muestra- la prueba puede darse como positiva.

### **3.1.10. Prueba de identificación de antocianinas.**

- A. Colocar la misma cantidad de muestra en tres tubos de ensaye (aproximadamente llenar la cuarta parte del tubo) y recubrir con etanol.
- B. Agitar levemente y dejar 5 min reposando.
- C. Dejar un tubo como control y a otro añadir 10 gotas de NaOH al 10% en agua.
- D. Al tercer tubo añadirle 4 gotas de HCl concentrado.
- E. Comparar los dos tubos con el control.
- F. La prueba se dará por positiva si hubo cambio de coloración con respecto al control.

#### **3.1.11. Prueba de identificación de grupo carbonilo (fenilhidrazina/etanol).**

- A. Colocar la muestra en el tubo de ensaye (rellenar una tercera parte del tubo) como se muestra en la y recubrir con un volumen de reactivo de fenilhidrazina/etanol.
- B. Calentar en baño María a 70°C por 15 minutos.
- C. Posteriormente llevar a baño de hielo (4°C) y dejar allí al menos media hora.
- D. Observar presencia de precipitado blanco es un positivo.

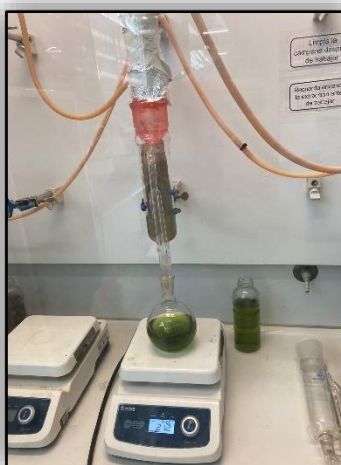
### **3.2 Obtención de extractos**

- A. Dentro de los primeros procedimientos que se realizaron para el inicio del proyecto fue la obtención tanto de árnica mexicana, como de árnica Montana, obteniendo grandes cantidades de ambas, de preferencia un poco más de 100 gramos, evitando que se encuentre en mal estado o contaminada por hongos.
- B. Posteriormente pasaron por un procedimiento de secado donde su porcentaje de humedad disminuyó considerablemente como se muestra en la **Figura 19**, y, por ende, igual su peso. Esto se realizó preferentemente en ausencia de luz para evitar que se desintegre o deteriore algún metabolito o sustancia que sea foto sensible.



*Figura 19. Planta seca de **Árnica mexicana** (hojas/flor)*

- C. Una vez que se obtuvo la planta completamente seca, se procedió a realizar una extracción de tipo diferencial donde se utilizaron disolventes en orden ascendente a su polaridad. Se introdujeron las respectivas plantas en 2 cartuchos de tela, para lograr acomodarla en los tubos de extracción del sistema Soxhlet, como se muestra en la **Figura 20**, en el cual, en la parte inferior donde se coloca el matraz de bola se encuentra el disolvente, en la parte media se encuentra el cartucho en donde se realiza la extracción de tipo diferencial y en la parte superior el condensador que evita que el disolvente se escape. Cada cartucho contenía aproximadamente 50 gramos de planta y hojas.



*Figura 20. Sistema de Extracción Soxhlet*

- D. Cuando se tuvieron listos los cartuchos de tela y se colocaron en los tubos de extracción, se utilizaron diversos disolventes con polaridades distintas, con el fin de que los componentes de los extractos que se obtuvieron se fueran disolviendo según el tipo de solvente que se utilizara y su polaridad. Cada extracción duraba aproximadamente 3 horas y los disolventes se fueron utilizando en un orden específico, de polaridad menor a mayor, para así, obtener diferentes componentes en cada uno de los extractos.
- E. Los disolventes para utilizar en orden ascendente a su polaridad fueron los siguientes:
- |                     |            |
|---------------------|------------|
| 1. Hexano           | 5. Acetona |
| 2. Éter etílico     | 6. Etanol  |
| 3. Acetato de etilo | 7. Metanol |
| 4. Dicloro metano   | 8. Agua    |
- F. Una vez obtenidos cada uno de los extractos, el siguiente proceso constaba en destilar el disolvente de cada extracto en un rotavapor para quedarnos únicamente con el extracto sin sus respectivos disolventes, a excepción del extracto de agua, ya que en ese caso solamente se concentró.
- G. Después del paso anterior, se procedió a secar cada uno de los matraces para evaporar el agua que aún se retuviera en el extracto y posteriormente se pesa cada uno de los matraces cuando ya estuviese seco con el extracto, esto con el fin de obtener una diferencia de pesos con respecto a los matraces vacíos previamente pesados.

### 3.3 Ensayo DPPH

#### **Fundamento del método:**

El ensayo DPPH se utiliza para determinar la actividad antioxidante de frutas (zumos), verduras, café, etc. Se basa en el grado de captación de radicales libres de compuestos antioxidantes presentes en la muestra como lo son ciertos metabolitos secundarios, los cuales logran donar un átomo de hidrogeno y reducir la molécula de DPPH a una forma no radicalaria. El reactivo es un compuesto de 1,1-difenil-2-picrilhidrazina de una coloración violeta intenso cuando está en solución con etanol o metanol y cuando moléculas antioxidantes logran reducirlo, la coloración violeta se desvanece

llegando a ser de un color amarilla como indicador de las propiedades antioxidantes de la muestra, (*Guía de Determinación de la actividad antioxidante.pdf*, s/f).

#### **Procedimiento:**

- A. La primera prueba que se llevó a cabo consistió en evaluar la captación de radicales libres de ambas plantas mediante el ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) y determinar la actividad antioxidante de la planta.
- B. Como primer paso de dicha prueba, se realizaron diluciones de 1:1000 (solución madre/etanol) en 10 ml de las respectivas soluciones madre de cada extracto, esto debido a que la concentración de los extractos es demasiado alta para ser detectada en el espectrofotómetro UV-Vis, aun cuando se realizó previamente una dilución de 1:10 de los extractos iniciales.
- C. Se utilizó un estándar de ácido gálico a una concentración de 0.1 mg/ml y como blanco de la muestra se utilizó etanol.
- D. Calibrar espectrofotómetro UV-VIS a 515 nm.
- E. Se utilizaron cubetas de plástico para medir las absorbancias en el espectrofotómetro, en las cuales, se le colocaron 2.3 ml de las muestras (incluyendo el blanco de la muestra y el estándar de ácido gálico) y por consiguiente añadir 0.7 ml del reactivo DPPH y esperar 60 min para medir la absorbancia del blanco de la muestra y del extracto a 515 nm.
- F. Posteriormente se calcula el porcentaje de inhibición (**ver Fórmula 1**) y se calcula el promedio y desviación estándar de dicho porcentaje. Cabe mencionar que estas pruebas se realizaron por triplicado en cada uno de los extractos de cada planta, por ello, se calcula un promedio y desviación estándar del porcentaje de inhibición de cada prueba.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs extracto}}{\text{Abs blanco}}$$

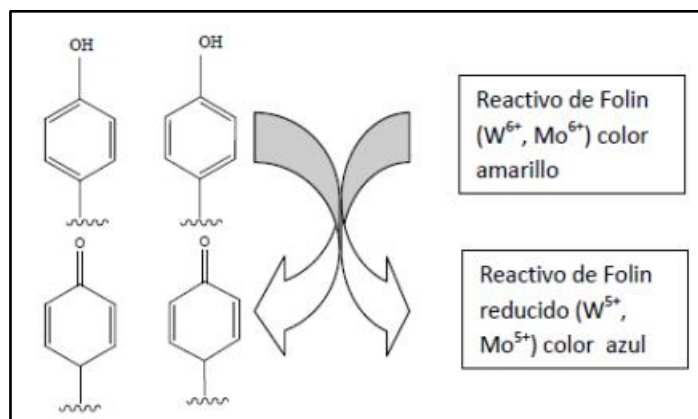
*Fórmula 1. Cálculo de porcentaje de inhibición*

### **3.4 Ensayo Folin-Ciocalteu**

#### **Fundamento del método:**

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza para cuantificar el grado de compuesto fenólicos presentes en plantas o frutas. Se basa en la reacción del reactivo con compuestos fenólicos en medio básico,

logrando tener una coloración azul, la cual refleja la concentración de dichos compuestos detectados y se pueden determinar en un espectrofotómetro a 760 – 765 nm. El reactivo Folin es una combinación de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico, de una coloración amarilla y al lograr ser reducido cuando reacciona con compuestos fenólicos presentes en la muestra, su coloración se torna azul (Véase en la **Figura 21**) y su intensidad depende de la concentración de grupos detectados en la muestra, (*García Martínez et al.pdf, s/f*).



**Figura 21. Mecanismo de acción del reactivo Folin-Ciocalteu**

### Procedimiento:

- A. Como primer paso, se utilizaron las diluciones previas que se utilizaron en el ensayo de DPPH, debido al mismo fundamento de la concentración en función de la detección del espectrofotómetro.
- B. Se utilizó un estándar de ácido gálico a una concentración de 0.036 mg/ml y como blanco de la muestra se utilizó etanol.
- C. Se utilizaron cubetas de plástico para medir las absorbancias en el espectrofotómetro, en las cuales, se le colocaron 150  $\mu$ l de las muestras (incluyendo el blanco de la muestra y el estándar de ácido gálico).
- D. Después se adicionaron 2250 microlitros de agua, esperar 1-2 minutos para que se mezcle bien en la cubeta y adicionar 150  $\mu$ l del reactivo de Folin, esperar 5 minutos en cada cubeta de las muestras para que se mezcle e interaccione adecuadamente con las muestras.
- E. Finalmente adicionar 450  $\mu$ l de  $CaCO_2$  y mezclar bien para aumentar la interacción de todos los compuestos de cada muestra.

- F. Una vez que se hayan preparado las muestras en las cubetas (**ver Figura 22**), se miden las absorbancias iniciales a 760 nm de cada una de las muestras de los extractos por triplicado y se dejan pasar 2 horas para volver a medir las absorbancias de las muestras de ambos extractos.
- G. Se debe calcular la absorbancia real de las muestras restando la absorbancia inicial a la absorbancia final (**ver Fórmula 2**).



*Figura 22. Ensayo Folin-Ciocalteu por triplicado*

$$\text{Absorbancia real} = \text{Abs final} - \text{Abs inicial}$$

*Fórmula 2. Cálculo de absorbancia real*

### **3.5 Evaluación antimicrobiana de metabolitos secundarios**

Para este ensayo antimicrobiano, primeramente, se hicieron medios de cultivo de agar LB, el cual es ideal para cultivar bacterias, tanto en medio sólido como en medio líquido, de manera que se lograra poner en práctica la actividad antimicrobiana de los extractos y un fármaco control, frente a 5 bacterias de interés.

Esta evaluación de igual manera se hacía por triplicado por cada muestra de extracto, por lo tanto, se necesitaron en total 15 medios de cultivo sólido y 15 de líquido en total para realizar dicho procedimiento, es decir, si tomamos en cuenta el fármaco de control y que las 8 soluciones madre de cada uno de los extractos estarán inmersos cada uno en un círculo de papel filtro pequeño que simule un sensidisco dentro de un mismo medio de cultivo, en total serían 5 medios de cultivo ya que son 5 bacterias con las que se evaluará la prueba, así mismo, serán pruebas por triplicado, en total serán 30 medios de cultivo a utilizar, 15 para árnica mexicana y los otros 15 para árnica Montana.

Se requería utilizar 3 bacterias que tuvieran relación importante con la piel o bien con la cicatrización (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*), una bacteria control que no tuviera relación significativa con la cicatrización (*Escherichia coli*) y una última que sea utilizada como control negativo ya que es una bacteria gram positiva, en comparación a las demás que son gram positivas (*Enterococcus faecalis*).

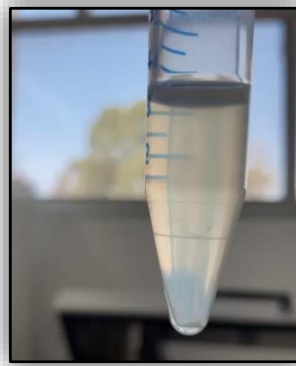
### **3.5.1 Medios de cultivo**

- A. Para la preparación de medios de cultivo de Agar LB líquido para el cultivo de bacterias, se utilizaron 200 ml de solución y en la formulación indica que se requieren 10 g/L de NaCl, 10g/L de peptona de caseína y 5 g/L de extracto de levadura, por ende, se utilizaron solamente 2 g de NaCl, 2 de peptona de caseína y 1 g de extracto de levadura.
- B. Por otra parte, en cuanto a la preparación de agar medio sólido teóricamente se necesitan aproximadamente 25 ml de agar para cada placa para medio sólido y de acuerdo con la formulación, se necesitan 35 g de agar para un litro de solución, por ende, se requerían 375 ml de solución, por lo que se realizó una regla de tres para calcular los gramos que se necesitaban para 375 ml de solución y se utilizó un matraz Erlenmeyer de 500 ml.
- C. Se utilizaron 13.125 g de agar para medio sólido para un total de 15 placas. Para ambas preparaciones se fundieron la cantidad de agar en condiciones de esterilidad en una autoclave a 120 °C durante 2 horas.

**Nota:** Para verter el medio líquido, se esperó a que se enfriara el medio y en condiciones de esterilidad, se inocularon las cepas de las 5 bacterias en tubos eppendorf para proliferar su

crecimiento y se incubaron a 37 °C en una incubadora giratoria durante 48 horas, la cual sirve para aumentar el % de bacterias en el inoculo y se podrá apreciar la turbidez del tubo posterior a las horas de incubación (**Ver Figura 23**).

Para determinar si hubo proliferación bacteriana en el tubo Eppendorf, se realiza un análisis visual en contraste de luz para observar si hay turbidez en el mismo. Posteriormente, en un tubo falcon de 10 ml, con una cantidad de 5 ml de agar LB líquido, se inoculó nuevamente una alícuota con el asa bacteriológica de los tubos eppendorf y nuevamente se incubaron a 37 °C durante 48 horas.



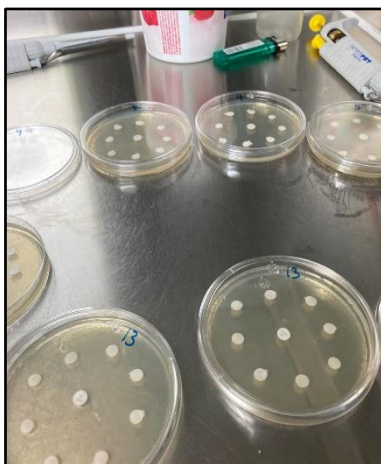
*Figura 23. Tubos Eppendorf con proliferación bacteriana (se muestra turbidez)*

Para el vertido de placas del agar LB sólido, se hizo en caliente en condiciones de esterilidad, cuidando que no se enfriara el medio para que no gelificara rápido y los medios estuviera en óptimas condiciones de preparación para la siembra de las cepas de los tubos falcon.

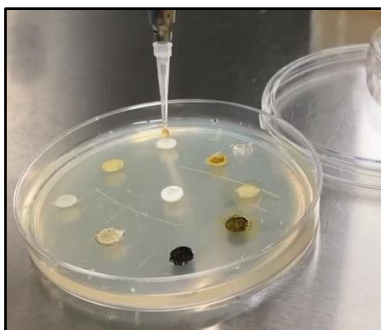
### **3.5.2 Siembra y colocación de extractos de ambas árnicas.**

- A. Una vez teniendo los medios de cultivo tanto líquidos como sólidos, el siguiente paso es preparar los sensidiscos de papel filtro de las soluciones madre de cada uno de los extractos al momento en que se siembra el inóculo de las bacterias.
- B. Como primer paso se hace la siembra de las cepas que se encuentran en los tubos falcon en los medios de agar LB sólido, añadiendo 150 µl mediante un estriado masivo. Esto se repite 3 veces por cada una de las bacterias, ya que el procedimiento se hace por triplicado, para que en total resulten 15 placas.

- C. Después del estriado masivo de en todas las placas, se colocan 8 círculos de papel filtro alrededor de cada una de las placas de la manera más simétrica posible, tal como se muestra en la **Figura 24**, y por consiguiente se le inyectan 100  $\mu$ l de cada solución madre de los extractos (**Ver figura 25**), además, se debe colocar un fármaco control de ácido clavulánico-amoxicilina en el centro de cada placa.
- D. Finalmente, cuando se tienen todos los sensidiscos en las placas, éstas se incubaron a 37 °C durante 48 horas para asegurarse un óptimo crecimiento bacteriano y medir los halos de inhibición, de los cuales, se les hizo un análisis mediante el método de Tukey, realizado en ANOVA, para crear intervalos de confianza para los diferentes grupos de medias de los datos registrados.



*Figura 24. Colocación de círculos de papel filtro en cada placa de manera simétrica y al centro el antibiótico control de ácido clavulánico-amoxicilina.*

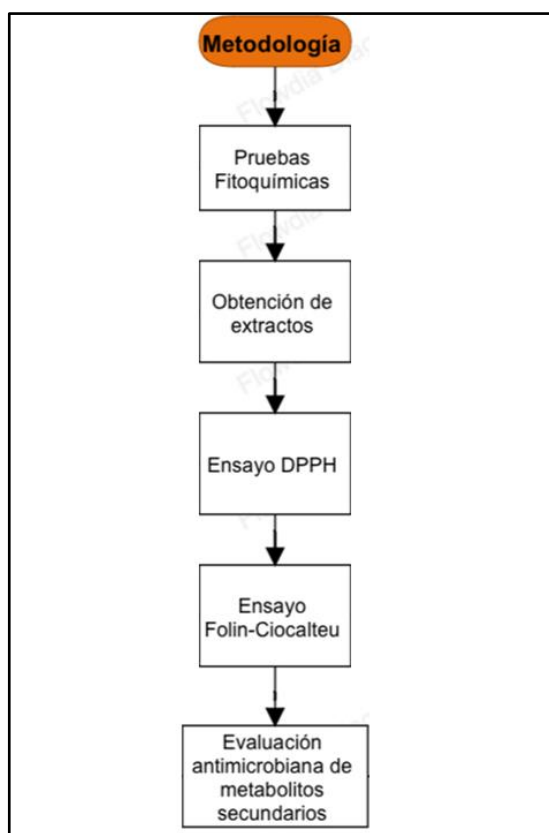


*Figura 25. Inyección de 100  $\mu$ l cada uno de los extractos de su previa solución madre*

### 3.6 Método de Tukey

Se realizó una prueba estadística mediante el método de Tukey con una ANOVA, para realizar agrupaciones de las medias de los extractos y determinar las diferencias significativas que tienen cada grupo y al mismo tiempo saber cuáles extractos son iguales o diferentes, estadísticamente hablando.

### 3.7 Diagrama de bloques



*Figura 26. Diagrama de bloques de la metodología utilizada*

## 4. Discusión de resultados

### 4.1 Pruebas Fitoquímicas.

#### 4.1.1. Esteroides y terpenos (Lieberman-Burchard).

Para esta prueba, únicamente el cambio de coloración fue de un color café oscuro en el tubo, sin embargo, no correspondía a ningún tipo de coloración de un tipo de esteroide o terpeno. La hipótesis que se sugiere, en cuanto al oscurecimiento del tubo es que se concentró aún más la planta al interactuar con el disolvente cloroformo o en su defecto, se deba a otro metabolito no detectado con una coloración específica de color café oscuro.

Por otra parte, el trozado de árnica mexicana arrojó un resultado positivo, mostrando una coloración naranja tenue, como se muestra en la **figura 27**.



*Figura 27. Prueba esteroides y terpenos negativa para árnica Montana*

#### 4.1.2. Prueba de Shinoda.

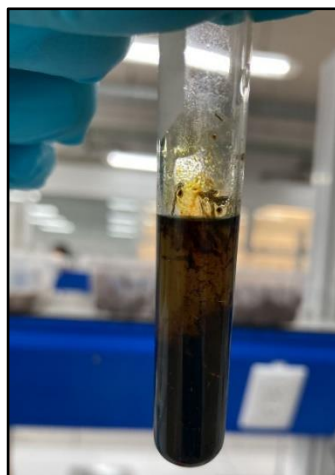
No se observó ningún cambio de coloración de ningún tubo de ambas plantas estudiadas (**Figura 28**), aun cuando la coloración tiende a desaparecer rápidamente.



*Figura 28. Prueba Shinoda Negativa para ambas plantas*

#### 4.1.3. Prueba de Salkowsky (identificación de esteroides y de flavonas).

Prueba positiva a flavonoles (coloración es amarilla, **Figura 29**)



*Figura 29. Flavonoles positivos en ambas plantas (+++)*

#### 4.1.4. Prueba de oxidrilos fenólicos, fenoles (CuSO<sub>4</sub> al 5%).

Formación de precipitado únicamente en la muestra de etanol de árnica mexicana, lo cual representa un resultado positivo, como se ilustra en la **figura 30**.

#### 4.1.5. Insaturaciones- Prueba del KMnO<sub>4</sub> (al 2% en agua) EN PLACA DE PORCELANA.

Se obtuvo un cambio de coloración (café) en las muestras de etanol de ambas plantas, al igual que la formación de precipitados, lo cual arroja un resultado positivo, (**Figura 30**).



*Figura 30. Insaturaciones (++) en ambas árnicas, Oxidrilos (+) en árnica mexicana*

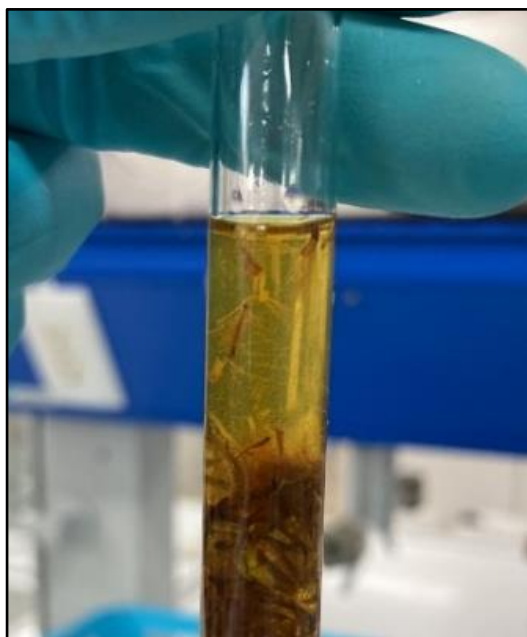
#### 4.1.6. Prueba de Molish

No hubo presencia de glúcidos teñidos por el reactivo de Molish, por lo que la prueba resultó negativa para árnica mexicana y árnica Montana.

#### 4.1.7. Para cumarinas- prueba de NaOH (10%, m/v en agua).

Para esta prueba hubo cambio de coloración (amarillo), como se muestra en la **figura 31**. El siguiente paso se realizó en una campana de extracción, donde se aciduló con 3 gotas de HCl

concentrado, en un periodo de tiempo corto se observó coloración amarilla desapareció, lo cual indicó que la prueba es positiva para el trozado de árnica Montana.



*Figura 31. Cumarinas positivas en árnica Montana*

#### **4.1.8. Para lactonas- prueba de KOH (10%, m/v en etanol).**

La coloración amarilla desaparece al momento de acidular el tubo, arrojando la prueba positiva solamente en árnica como se ilustra en la **figura 32**.



*Figura 32. Lactonas positivas en árnica Montana*

#### **4.1.9. Prueba de Saponinas (Test de espuma).**

No hubo presencia de saponinas que reaccionaran con moléculas de agua en ninguna de las dos plantas, por lo que la prueba resultó negativa en ambas plantas.

#### **4.1.10. Prueba de identificación de antocianinas.**

La prueba fue positiva al reflejarse un cambio de coloración con respecto al control en ambas plantas. Esta prueba también se realizó en la campana de extracción.

#### **4.1.11. Prueba de identificación de Grupo carbonilo**

La prueba fue negativa para ambas plantas debido a que no se observó ningún tipo de precipitado en el baño de hielo para ambas plantas en ninguno de los 3 ensayos.

A continuación, se plasman los resultados de en la **Tabla 1** de todas las pruebas fitoquímicas realizadas en muestras de árnica mexicana y Montana.

#### 4.1.12 Resultados pruebas fitoquímicas:

*Tabla 1. Resultados por triplicado de pruebas fitoquímicas del árnica mexicana y Montana.*

Prueba	Árnica mexicana		Árnica Montana	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
<b>Esteroides y terpenos</b>	+			Negativo
	(triterpenos)			
<b>Prueba de Shinoda (Flavonoides)</b>		Negativo		Negativo
<b>Prueba de Salkowsky (identificación de esteroides y de flavonas)</b>	+++		+++	
	(flavonoles)		(flavonoles)	
<b>Prueba de oxidrilos fenólicos (Fenoles)</b>	+			Negativo
<b>Insaturaciones (KMnO4)</b>	++		++	
<b>Prueba de Molish</b>		Negativo		Negativo
<b>Cumarinas</b>		Negativo	+	
<b>Lactonas</b>		Negativo	+	
<b>Saponinas (Test de espuma)</b>		Negativo		Negativo
<b>Antocianinas</b>	+		+	
<b>Grupo carbonilo (fenilhidrazina/etanol)</b>		Negativo		Negativo

En relación con lo cualificado, se puede denotar que, de acuerdo con la literatura anteriormente mencionada, se encontraron otros metabolitos secundarios en estas pruebas fitoquímicas, sin embargo, destacan la diferencia en cuanto el contenido de estos dependiendo la planta. Dentro de la categoría de los terpenos, como se muestra en la **Figura 27**, solo el árnica mexicana cuenta con estos al igual y como se mencionó en la literatura.

La prueba de Shinoda para la determinación de polifenoles como flavonoides, no tuvo resultados positivos, **Figura 28**, caso contrario a la de Salkowsky, que determinó la presencia de flavonoles, **Figura 29**, los cuales son compuestos orgánicos que tienen un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo hidroxilo (-OH) en la posición 5, caso contrario a otros flavonoides que no cuentan con este último grupo en su estructura. Dichos compuestos fueron encontrados en ambas plantas en cantidades importantes.

Otros flavonoides encontrados de los cuales no se mencionan en la literatura, fueron algunas antocianinas, las cuales son pigmentos solubles que se encuentran en muchas plantas y tienen como característica de que cuentan con al menos 2 anillos aromáticos.

Compuestos fenólicos como oxidrilos fenólicos también se cualificaron (**Figura 30**) en la flor de árnica mexicana. Otros compuestos orgánicos encontrados fueron cumarinas, caracterizadas por ser moléculas cristalinas e incoloras, (**Figura 31**), y lactonas en flor y hojas de árnica Montana, las cuales cuentan con un grupo éster dentro de un anillo aromático en su estructura (**Figura 32**).

Nota: No se tomaron fotos cuando se trabajó en la campana de extracción y preferentemente cuando se trabajó con reactivos corrosivos o peligrosos como el HCl concentrado.

No se encontraron ningún tipo de azúcares ni saponinas. Este último es un tipo de metabolito secundario muy común en las plantas medicinales, sin embargo, este no se menciona en la literatura previamente consultada.

No se encontraron esteroides en ninguna muestra de trozado de ambas árnicas, así como tampoco se hallaron sesquiterpenos de ningún tipo en ninguna estructura del árnica mexicana.

## 4.2 Obtención de Extractos

### 4.2.1 Cuantificación de extractos de árnica mexicana y Montana:

Cuando se obtuvieron las diferencias de pesos de cada matraz, se registraron los valores en las **Tablas 2 y 3**, respectivamente y se obtuvieron los resultados de la cantidad real de árnica que fue extraída. Una vez obtenido estos datos, se tuvo que formular y preparar soluciones madre en relación 1:10 (extracto/etanol) en tubos “falcon” de cada uno de los extractos de ambas árnicas, esto se hace

con el fin de obtener una referencia del extracto obtenido y saber que cantidad de volumen utilizar para cada tubo.

*Tabla 2. Pesos totales de extractos de árnica mexicana y volúmenes de solución madre.*

<b>Árnica mexicana</b>				
<b>Disolvente</b>	<b>Peso Matraz Vacío (g)</b>	<b>Peso Matraz con extracto (g)</b>	<b>Peso extracto (g)</b>	<b>Volumen a utilizar p/sln madre</b>
<b>Hexano</b>	176.37	177.112	0.742	7.4
<b>Éter Etilico</b>	177.51	177.5785	0.0685	0.6
<b>DCM</b>	168.64	168.6508	0.0108	0.1
<b>Ac. EtO</b>	171.79	172.2481	0.4581	4.5
<b>Acetona</b>	162.04	162.1526	0.1126	1.1
<b>Etanol</b>	176.37	176.8381	0.4681	4.6
<b>Metanol</b>	177.51	177.81	0.3	3
<b>Agua</b>	168.64			10

Para la obtención de extractos de árnica mexicana, los extractos con mejores resultados fueron los de agua, hexano, etanol, acetato de etilo y metanol respectivamente, sin embargo, la obtención en gramos de cada extracto se vio bastante limitada, ya que en comparación a otros disolventes como el dicloro metano, estos fue más complicado obtener un producto más purificado y esto se puede deber a que los disolventes utilizados donde no se obtuvo gran cantidad de producto, son demasiado volátiles, es decir, que cuentan con una presión de vapor muy alta como el éter etílico diclorometano y acetona, por lo que a bajas temperaturas, tienden a pasar a una fase de vapor más rápidamente.

*Tabla 3. Pesos totales de extractos de árnica Montana y volúmenes de solución madre.*

<b>Árnica Montana</b>				
<b>Disolvente</b>	<b>Peso Matraz Vacío (g)</b>	<b>Peso Matraz con extracto (g)</b>	<b>Peso extracto (g)</b>	<b>Volumen a utilizar p/solución madre (ml)</b>
<b>Hexano</b>	176.37	177.6897	1.3197	13
<b>Éter Etilico</b>	177.51	178.3515	0.8415	8.4
<b>DCM</b>	168.64	169.2233	0.5833	5.8
<b>Ac. EtO</b>	171.79	173.2571	1.4671	14.6
<b>Acetona</b>	162.04	162.8055	0.7555	7.5
<b>Etanol</b>	168.64	169.9503	1.3103	13.1
<b>Metanol</b>	176.37	178.84.25	2.4725	24.7
<b>Agua</b>	162.04	-	-	10

Por otra parte, en cuanto a la obtención de extractos de árnica Montana, se obtuvieron mejores resultados, ya que principalmente la recolección esta planta fue aún más sofisticada, pues se consiguió por medios externos en comparación a la recolección del árnica mexicana, que fue recolectada en campo y no contaba con un acondicionamiento del todo adecuado.

Del mismo modo, los extractos de árnica Montana donde se obtuvieron mejores resultados fueron los de metanol, acetato de etilo, etanol y hexano respectivamente, nuevamente bajo el mismo criterio antes mencionado de los disolventes utilizados del árnica mexicana.

### **4.3 Ensayo DPPH**

#### **4.3.1 Resultados DPPH**

Los resultados obtenidos de las absorbancias del ensayo DPPH se observan en las **tablas 4 y 5**, de los cuales, a partir de ellos, se realizaron agrupaciones por el método de Tukey para determinar si hay diferencias significativas entre los extractos, como se muestra en las **tablas 6 y 7**.

*Tabla 4. Resultados por triplicado del ensayo DPPH de las 8 muestras correspondientes a las extracciones realizadas del árnica mexicana.*

<b>Absorbancias árnica mexicana</b>				
<b>Disolvente</b>	<b>Abs blanco (60 min)</b>	<b>Abs extracto (60 min)</b>	<b>% inhibición de RL</b>	<b>D.E.</b>
<b>Hexano</b>	2.07066667	0.97633333	52.85	1.65912298
<b>Éter Etlíco</b>	2.11833333	1.12	47.13	0.30891032
<b>AcOEt</b>	2.047	1.85566667	9.35	0.38022767
<b>DCM</b>	2.18133333	1.826	16.29	1.89575911
<b>Acetona</b>	2.024	0.37866667	81.29	0.63868708
<b>Etanol</b>	2.26966667	0.335	85.24	0.67413669
<b>Metanol</b>	2.26966667	0.296	86.96	0.50488417
<b>Agua</b>	2.18133333	1.05366667	51.70	6.55618377

*Tabla 5. Resultados por triplicado del ensayo DPPH de las 8 muestras correspondientes a las extracciones realizadas del árnica Montana.*

<b>Absorbancias árnica Montana</b>				
<b>Disolvente</b>	<b>Abs blanco (60 min)</b>	<b>Abs extracto (60 min)</b>	<b>% inhibición de RL</b>	<b>D.E.</b>
<b>Hexano</b>	2.112	1.27266667	39.74	0.61462019
<b>Éter Etlíco</b>	2.04966667	1.12	45.36	0.8561433
<b>AcOEt</b>	2.04966667	0.266	87.02	0.12472266
<b>DCM</b>	2.112	1.27266667	39.74	0.61462019
<b>Acetona</b>	2.146	0.274	87.23	1.45260869
<b>Etanol</b>	2.044	0.26066667	87.25	0.45597002
<b>Metanol</b>	2.146	0.25033333	88.33	1.39605037

<b>Agua</b>	2.044	0.404	80.23	0.07975184
-------------	-------	-------	-------	------------

### 4.3.2 DPPH Árnica Mexicana

*Tabla 6. Agrupaciones por método de Tukey para DPPH para a. mexicana*

Disolvente	N	Media	Agrupación		
<b>Metanol</b>	3	86.953	A		
<b>Etanol</b>	3	85.231	A		
<b>Acetona</b>	3	81.275	A		
<b>Hexano</b>	3	52.863		B	
<b>Agua</b>	3	51.60		B	
<b>Éter Etilico</b>	3	47.128		B	
<b>DCM</b>	3	16.30			C
<b>AcOEt</b>	3	9.35			C

El reactivo de DPPH consta de una molécula estable de radicales libres, la cual se utiliza para determinar la capacidad antioxidante de plantas, teniendo la propiedad de aceptar un átomo de hidrógeno por parte de una molécula antioxidante tales como los metabolitos secundarios presentes en los extractos de las plantas en cuestión.

El análisis realizado para el ensayo con el reactivo de DPPH, mostró diferencias significativas en cuanto a la capacidad antioxidante de los diferentes extractos al realizar con ANOVA el método de Tukey, en el cual se puede denotar que los extractos del árnica mexicana se agruparon en 3 diferentes grupos (A, B y C).

La capacidad antioxidante de la planta se ve reflejada en el porcentaje de inhibición que presentan principalmente los extractos de metanol, etanol y acetona, los cuales se agruparon (A) y son estadísticamente iguales y representan un intervalo de confianza del 95 % de acuerdo con el método utilizado. Del mismo modo, los extractos de hexano, agua y éter son estadísticamente iguales, al mismo tiempo que los de diclorometano y acetato de etilo, sin embargo, estas agrupaciones entre sí son distintas estadísticamente hablando. Ahora bien, extrapolando los resultados experimentales hacia la parte farmacéutica y con el objetivo real de esta investigación, podemos decir que entre los

extractos del grupo A, los cuales son estadísticamente iguales, se podría utilizar principalmente los de etanol, ya que es más barato conseguirlo y es menos toxico si lo comparamos con el metanol y acetona, por ello, se puede utilizar más adelante para una formulación farmacéutica de un gel o crema para que se utilice como cicatrizante.

Cabe destacar que la mayoría de los metabolitos secundarios detectados en las pruebas fitoquímicas, son solubles en disolventes orgánicos con excepción de las antocianinas que son solubles en agua, (Heras et al., 2013). Los flavonoides, terpenos, lactonas y cumarinas son solubles en disolventes orgánicos y principalmente en alcoholes, (*Metabolitos secundarios, indicadores de calidad (Henequén)*, s/f), pero principalmente los flavonoides son solubles en la mayoría de los solventes acuosos como son el agua y los alcoholes, (López Luengo, 2002). Haciendo este análisis, se destaca la actividad antioxidante de los extractos del grupo A, ya que, debido a las características antes mencionadas, resultan ser los mejores en cuanto a captar e inhibir radicales libres, además de que los metabolitos secundarios detectados, son solubles principalmente en solventes polares y orgánicos.

#### 4.3.3. DPPH Montana

*Tabla 7. Agrupaciones por método de Tukey para DPPH para a. Montana*

Disolvente	N	Media	Agrupación			
Metanol	3	88.337	A			
Etanol	3	87.247	A			
Acetona	3	87.234	A			
AcOEt	3	87.0226	A			
Agua	3	80.2347		B		
Éter Etílico	3	45.349			C	
DCM	3	39.74				D
Hexano	3	39.737				D

En cuanto al análisis antioxidante de los extractos de árnica Montana, los extractos que mostraron mejores resultados para la captación e inhibición de radicales libres son metanol, etanol, acetona y acetato de etilo, los cuales son estadísticamente iguales.

De igual forma, el extracto a utilizar para este caso sería el de etanol dada a su baja toxicidad y en contraste con el metanol es altamente tóxico, pues puede provocar ceguera permanente o incluso la muerte, el diclorometano es irritante para la piel y al inhalarlo puede afectar el tracto respiratorio al igual que la acetona, además este último puede causar dolor de cabeza, náuseas o confusión, entre otras afecciones que pueden desencadenar eventos crónicos, (*icsc 0057 - metanol, s/f*), (*icsc 0058 - diclorometano, s/f*), (*acetona (acetone) | toxfaq | atsd, 2022*).

#### 4.4 Ensayo Folin-Ciocalteu

##### 4.4.1 Resultados Ensayo Folin-Ciocalteu:

*Tabla 8. Resultados por triplicado del ensayo Folin-Ciocalteu de las 8 muestras correspondientes a las extracciones realizadas de árnica mexicana*

<b>Absorbancias árnica Montana</b>			
<b>Disolvente</b>	<b>Abs inicial</b>	<b>Abs final</b>	<b>Abs real</b>
<b>Hexano</b>	0.134333333	0.283333333	0.149
<b>Éter etílico</b>	0.073	0.441	0.368
<b>AcOEt</b>	0.090666667	0.138	0.047333333
<b>DCM</b>	0.077666667	0.289333333	0.211666667
<b>Acetona</b>	0.070666667	0.596666667	0.526
<b>Etanol</b>	0.098666667	0.286	0.187333333
<b>Metanol</b>	0.106666667	0.317333333	0.210666667
<b>Agua</b>	0.071	0.201666667	0.130666667

*Tabla 9. Resultados por triplicado del ensayo Folin-Ciocalteu de las 8 muestras correspondientes a las extracciones realizadas de árnica Montana*

<b>Absorbancias árnica Montana</b>			
<b>Disolvente</b>	<b>Abs inicial</b>	<b>Abs final</b>	<b>Abs real</b>
<b>Hexano</b>	0.151666667	0.459666667	0.308
<b>Éter etílico</b>	0.096333333	0.253666667	0.157333333
<b>AcOEt</b>	0.154333333	0.902666667	0.748333333
<b>DCM</b>	0.09	0.259333333	0.169333333
<b>Acetona</b>	0.073333333	0.484	0.410666667
<b>Etanol</b>	0.144	0.635666667	0.491666667

<b>Metanol</b>	0.204	1.22633333	1.02233333
<b>Agua</b>	0.066	0.335	0.269

#### 4.4.2 Folin A mexicana

*Tabla 10. Agrupaciones por método de Tukey de Folin para a. mexicana*

<b>Disolvente</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>							
<b>Etanol</b>	2	52.673	A							
<b>Metanol</b>	2	47.617		B						
<b>Hexano</b>	2	38.616			C					
<b>Acetone</b>	3	22.301				D				
<b>AcOEt</b>	2	16.787					E			
<b>Éter Etilico</b>	3	9.551						F		
<b>DCM</b>	3	0.8793								G
<b>Agua</b>	3	0.07704								G

Para la determinación de compuestos fenólicos en las muestras de extractos de árnica mexicana, existen diferencias significativas en la mayoría de las muestras, ya que dada las agrupaciones realizadas por el método de Tukey, nos muestra que el extracto de etanol muestra mejores resultados en comparación de los demás, seguido del metanol y el hexano, por lo tanto, utilizaríamos el etanol dados los criterios antes mencionados en el ensayo de DPPH, además esto nos indica que los compuestos fenólicos como los polifenoles son mayoritariamente solubles en disolventes acuosos y orgánicos como lo es el etanol.

En las pruebas fitoquímicas previamente realizadas, se encontraron flavonoles en los trozados de árnica mexicana y debido a los resultados del ensayo Folin, se comprueba la presencia de estos metabolitos secundarios como una de las principales moléculas antioxidantes y las mayormente propuestas para un tratamiento cicatrizante.

#### 4.4.3 Folin A Montana

*Tabla 11. Agrupaciones por método de Tukey de Folin para a. Montana*

Disolvente	N	Media	Agrupación			
Metanol	2	1030.52	A			
AcOEt	2	462.32		B		
Etanol	2	277.74			C	
Hexano	2	147.52				D
Acetone	3	117.30				E
Éter Etilico	3	51.55				F
DCM	3	38.33				G
Agua	3	0.15404				H

Por otra parte, en el ensayo Folin realizado para extractos de árnica Montana, nos dice que el extracto que mayor cantidad de compuestos fenólicos contenía y se obtuvieron mejores resultados en el ensayo fue el de metanol, sin embargo, anteriormente se mencionó su grado de toxicidad y mortalidad, por lo que no es recomendable su utilización para fines prácticos y terapéuticos.

#### 4.5 Evaluación antimicrobiana de metabolitos secundarios

##### 4.5.1 Resultados de Evaluación Antimicrobiana

##### 4.5.1.1 Enterococcus faecalis

*Tabla 12. Agrupaciones por método de Tukey de la evaluación antimicrobiana de E. faecalis para a. mexicana*

Disolvente	N	Media	Agrupación			
Control	3	2.667	A			
Etanol	3	1.833		B		
Acetone	3	1.733		B	C	
Éter Etilico	3	1.500		B	C	
Metanol	3	1.167		B	C	
AcOEt	3	1.000			C	
Agua	3	0.000000				D
Hexano	3	0.000000				D
DCM	3	0.000000				D

*E. faecalis* es una bacteria presente en el tracto gastrointestinal, causante de enfermedades como otitis media aguda, sinusitis, faringoamigdalitis e infecciones en el tracto respiratorio, piel y tracto genitourinario. Normalmente, si la bacteria causa alguna infección, esta puede ser tratada con un solo antibiótico como ampicilina o amoxicilina, (*Infecciones por enterococos - Enfermedades infecciosas*, s/f).

Dadas las agrupaciones determinadas por el método de Tukey mostrada en la **tabla 12**, *Enterococcus faecalis*, la cual es un microorganismo que resultó sensible al fármaco control principalmente (A), seguido de los extractos de etanol, acetona, éter, metanol y acetato de etilo, respectivamente.

Dado que el ácido clavulánico-amoxicilina es un antibiótico que consiste en amoxicilina, un antibiótico  $\beta$ -lactámico, y clavulanato de potasio, un inhibidor de  $\beta$ -lactamasa, y actúan sobre la pared celular de bacterias gram positivas principalmente, como *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y algunas bacterias gram negativas como *E. coli*, su actividad antimicrobiana se vio reflejada en el ensayo como el más idóneo a utilizar, (*Amoxicilina*, s/f).

Sin embargo, el extracto que obtuvo nuevamente mejores resultados en comparación a los demás fue el de etanol, el cual es igual de potente estadísticamente hablando que el de acetona, éter y metanol. Estos 3 últimos tienen la misma actividad comparado con el extracto de acetato de etilo, pero este es, en contraste con el de etanol, estadísticamente diferente.

Los extractos de agua, hexano y diclorometano no tuvieron actividad antimicrobiana, por lo que se puede deber a que los metabolitos secundarios no son lo suficientemente solubles en estos disolventes y no se retuvieron en dichos extractos.

#### 4.5.1.2 Escherichia coli

*Tabla 13. Agrupaciones por método de Tukey de la evaluación antimicrobiana de E. coli para a. mexicana*

Disolvente	N	Media	Agrupación		
Etanol	3	2.000	A		
Control	3	2.000	A		
Metanol	3	1.333	A	B	
Éter Etilico	3	1.333	A	B	
AcOEt	3	1.333	A	B	
Acetone	3	0.833		B	
Agua	3	0.000000			C
Hexano	3	0.000000			C
DCM	3	0.000000			C

*E. coli* es un bacilo gram negativo presente en la mayoría de los ambientes existentes, predominante en la flora intestinal y es causante de enfermedades entéricas y diarreicas, por lo que representa uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial y es de vital importancia hacer un diagnóstico adecuado. (Canata et al., 2016).

En cuanto a las determinaciones por el método de Tukey (**tabla 13**), el extracto de etanol y el fármaco control, tienen la misma eficiencia y poder antimicrobiano, sin embargo, cuentan con actividades antimicrobianas similares a las de los de metanol, éter, acetato de etilo y acetona.

Nuevamente los extractos de agua, hexano y diclorometano no tuvieron ninguna actividad antimicrobiana.

#### 4.5.1.3 *Pseudomonas fluorescens*

Tabla 14. Agrupaciones por método de Tukey de la evaluación antimicrobiana de *P. fluorescens* para *a. mexicana*

Disolvente	N	Media	Agrupación	
Etanol	3	2.500	A	
Control	3	2.500	A	
AcOEt	3	2.000	A	
Acetone	3	2.000	A	
Metanol	3	1.833	A	
Éter Etilico	3	1.833	A	
Agua	3	0.000000		B
Hexano	3	0.000000		B
DCM	3	0.000000		B

*Pseudomonas fluorescens* es una bacteria gram negativa que se encuentra alrededor de todo el mundo, especialmente en suelo y agua, y es poco común en infecciones de piel y tejidos blandos, son bacilos gram negativos relacionados estrechamente con *P. aeruginosa* y al igual que esta, son microorganismos oportunistas que generalmente llegan a infectar a algún paciente que sea inmunocompetente, primordialmente en infecciones nosocomiales o en pacientes que presenten comorbilidades que conlleven al contagio de estas bacterias, (Singh et al., 2021).

Los resultados de la prueba de Tukey nos señalan que el extracto de etanol, agrupado en la familia A (**tabla 14**), es el que presenta los mejores resultados al igual que el fármaco control, aun cuando tienen una actividad similar a la de los extractos de acetato de etilo, acetona, metanol y éter, estadísticamente hablando.

Extractos de agua, hexano y diclorometano respectivamente, no tuvieron actividad antimicrobiana contra *P. fluorescens*.

#### 4.5.1.4 Acinetobacter baumannii

Tabla 15. Agrupaciones por método de Tukey de la evaluación antimicrobiana de *A. baumannii* para *a. mexicana*

Disolvente	N	Media	Agrupación			
Éter Etilico	3	3.333	A			
Etanol	3	3.000	A	B		
Control	3	2.333	A	B	C	
Acetona	3	1.667	A	B	C	D
AcOEt	3	1.500		B	C	D
Metanol	3	0.667			C	D
Agua	3	0.000000				D
Hexano	3	0.000000				D
DCM	3	0.000000				D

*Acinetobacter baumannii* es un cocobacilo gram negativo, aerobio estricto, causante de muchas infecciones y enfermedades nosocomiales como neumonía, meningitis, bacteriemia, infecciones en el tracto urinario e infecciones en la piel y tejidos blandos. Comúnmente el tratamiento para infecciones causadas por esta bacteria se utilizan los carbapenemes como el meropenem, sin embargo, se ha reportado que la resistencia a antibióticos como los carbapenemes, mediada especialmente por las  $\beta$ -lactamasas de clase D y las metalo- $\beta$ -lactamasas de clase B, ha aumentado de manera importante (Hiraki et al., 2013).

Para este análisis en especial mostrado en la **tabla 15**, la agrupación de Tukey nos muestra que el extracto de éter tuvo una mayor eficacia al inhibir el crecimiento bacteriano de *A. baumannii*, teniendo una actividad similar estadísticamente hablando a la del extracto de etanol, acetona y el antibiótico de control. Estos tres últimos son estadísticamente similares al extracto de acetato de etilo (B). El fármaco control y los extractos de acetona y acetato de etilo son igual de potentes que el metanol (C), y este último tiene una actividad similar a los 3 extractos restantes (Agrupación D), lo cual nos habla de una ambigüedad, donde puede o no tener actividad antimicrobiana el extracto de metanol.

Cabe destacar que la bacteria analizada, aun cuando se reportó en investigaciones sobre su resistencia a fármacos carbapenémicos como lo es el fármaco control (betalactámico), esta logró ser sensible en gran medida al antibiótico.

#### 4.5.1.5 Pseudomonas aeruginosa

Tabla 16. Agrupaciones por método de Tukey de la evaluación antimicrobiana de *P. aeruginosa* para *a. mexicana*

Disolvente	N	Media	Agrupación	
Etanol	3	2.000	A	
Acetona	3	1.900	A	
Metanol	3	1.167	A	B
AcOEt	3	1.167	A	B
Agua	3	0.000000		B
Hexano	3	0.000000		B
Éter Etilico	3	0.000000		B
DCM	3	0.000000		B
Control	3	0.000000		B

Los extractos que tuvieron mejores resultados en cuanto a actividad antimicrobiana fueron el de etanol, acetona, metanol y acetato de etilo, respectivamente, donde estos dos últimos mostraron dos actividades distintas, demostrando que pueden o no tener actividad antimicrobiana como los extractos del grupo B, (**tabla 16**).

Esta bacteria gram negativa es multirresistente a una gran variedad de antibióticos, particularmente a los betalactámicos y se debe a la gran impermeabilidad que posee en su membrana celular y la presencia de enzimas como  $\beta$ -lactamasas de 2 tipos: Amp-C y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Estas últimas son enzimas denominadas carbapenemasas y se manifiestan por tener resistencia a penicilinas, cefalosporinas y fármacos carbapenémicos, (Gómez Álvarez et al., 2005). Dentro de la literatura se ha documentado la resistencia que han presentado diversas bacterias ante los fármacos carbapenémicos mediada por la presencia de  $\beta$ -lactamasas en las bacterias como mecanismo de defensa, (Hiraki et al., 2013), y es por ello que se puede justificar por qué no tuvo actividad el fármaco control de ácido clavulánico-amoxicilina, dando la alta resistencia antimicrobiana de dicha bacteria, pero por otra parte, destaca la gran sensibilidad que tuvo ante el extracto etanólico, el cual, tuvo una media mas alta en comparación a los demás extractos, independientemente de la similitud estadística que presenta con el extracto de acetona, metanol y acetato de etilo (agrupación A).

Los extractos de agua, hexano, éter, diclorometano y el fármaco control antes mencionado, no tuvieron ningún tipo de actividad para inhibir la proliferación de *P. aeruginosa*.

**Tabla 17. Medición de halos de inhibición de árnica mexicana**

<b>Halos de inhibición árnica mexicana</b>											
<b>Disolvente</b>	<b>Concentración del extracto (g/mL)</b>	<b>Halo (mm)</b>									
		<b>Cepa 4</b>	<b>D.E.</b>	<b>Cepa 5</b>	<b>D.E.</b>	<b>Cepa 7</b>	<b>D.E.</b>	<b>Cepa 9</b>	<b>D.E.</b>	<b>Cepa 13</b>	<b>D.E.</b>
<b>Control</b>	/	2.67	0.29	2.00	0.00	2.50	0.00	2.33	0.58	0.00	0.00
<b>Hexano</b>	<b>7.4</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Éter etílico</b>	<b>0.6</b>	1.50	0.50	1.33	0.58	1.83	1.44	3.33	1.15	0.00	0.00
<b>AcOEt</b>	<b>4.5</b>	1.00	0.00	1.33	0.29	2.00	0.00	1.50	0.00	1.17	0.29
<b>DCM</b>	<b>0.1</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Acetona</b>	<b>1.1</b>	1.73	0.46	0.83	0.29	2.00	0.00	1.67	0.29	1.90	0.36
<b>Etanol</b>	<b>4.6</b>	1.83	0.29	2.00	0.00	2.50	0.00	3.00	0.50	2.00	0.87
<b>Metanol</b>	<b>3</b>	1.17	0.29	1.33	0.29	1.83	0.76	0.67	1.15	1.17	0.76
<b>Agua</b>	/	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

De manera resumida y de acuerdo con todos los datos recabados en cada una de las evaluaciones de los extractos con las 5 bacterias utilizadas, el extracto de etanol fue el que tuvo mejores resultados en cuanto a la inhibición bacteriana de todas las bacterias, en la mayoría de los ensayos realizados.

#### 4.5.1.6 Enterococcus faecalis

**Tabla 18. Agrupaciones por método de Tukey de la evaluación antimicrobiana de *E. faecalis* para *a. Montana***

<b>Disolvente</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>			
<b>Control</b>	<b>3</b>	<b>2.333</b>	<b>A</b>			
<b>Etanol</b>	<b>3</b>	<b>2.000</b>	<b>A</b>	<b>B</b>		
<b>Metanol</b>	<b>3</b>	<b>1.500</b>		<b>B</b>	<b>C</b>	
<b>Acetone</b>	<b>3</b>	<b>1.500</b>		<b>B</b>	<b>C</b>	
<b>Éter Etilico</b>	<b>3</b>	<b>1.167</b>			<b>C</b>	
<b>AcOEt</b>	<b>3</b>	<b>1.000</b>			<b>C</b>	
<b>Agua</b>	<b>3</b>	<b>0.000000</b>				<b>D</b>
<b>Hexano</b>	<b>3</b>	<b>0.000000</b>				<b>D</b>
<b>DCM</b>	<b>3</b>	<b>0.000000</b>				<b>D</b>

Para el análisis antimicrobiano para extractos de árnica Montana, (**tabla 18**), el fármaco control por obviedad fue el que tuvo mejores resultados antimicrobianos ya que anteriormente en la evaluación antimicrobiana de árnica mexicana se destacó la sensibilidad de *E. faecalis* al fármaco control y del mismo modo al extracto de etanol, ya que son estadísticamente iguales de acuerdo con método de Tukey. Por otra parte, el extracto de etanol y los extractos del grupo B son iguales estadísticamente hablando, sin embargo, el control y los extractos del grupo B son significativamente diferentes estadísticamente hablando, al igual que el extracto de etanol con los del grupo C. Extractos de metanol y acetona son estadísticamente iguales en actividad que los de éter y acetato de etilo. Una vez más, los extractos de agua, hexano y diclorometano no presentaron actividad antimicrobiana.

#### 4.5.1.7 Escherichia coli

*Tabla 19. Agrupaciones por método de Tukey de la evaluación antimicrobiana de E. coli para a. Montana*

Disolvente	N	Media	Agrupación			
Etanol	3	2.000	A			
Control	3	2.000	A			
Metanol	3	1.500		B		
Éter Etilico	3	1.500		B		
AcOEt	3	1.500		B		
Acetona	3	1.000			C	
Agua	3	0.000000				D
Hexano	3	0.000000				D
DCM	3	0.000000				D

La evaluación antimicrobiana de los extractos de árnica Montana mostró diferencias significativas de todos los grupos, ya que todos son diferentes entre sí, sin embargo, el extracto de etanol con el fármaco control, son estadísticamente iguales, al igual que el extracto de metanol, éter y acetato de etilo, como se muestra en la **tabla 19**, respectivamente. El extracto de acetona fue el único que mostró más diferencias significativas en cuanto a agrupaciones y similitudes de actividad, pero fue el extracto que menos actividad antimicrobiana tuvo. Extractos del grupo D no presentaron actividad antimicrobiana alguna.

#### 4.5.1.8 Pseudomonas fluorescens

Tabla 20. Agrupaciones por método de Tukey de la evaluación antimicrobiana de *P. fluorescens* para *a. Montana*

Disolvente	N	Media	Agrupación	
Etanol	3	2.5	A	
Control	3	2.5	A	
Metanol	3	2.167	A	
AcOEt	3	2	A	
Acetone	3	2	A	
Éter Etílico	3	1.833	A	
Agua	3	0		B
Hexano	3	0		B
DCM	3	0		B

*P. fluorescens* se comportó de la misma manera frente a los extractos de ambas árnicas, de manera que los resultados de la prueba de Tukey (Tabla 20), nos señalan de igual manera que el extracto de etanol, agrupado en la familia A, es el que presenta los mejores resultados al igual que el fármaco control, aun cuando tienen una actividad similar a la de los extractos de metanol, acetato de etilo, acetona, y éter, respectivamente. Extractos de agua, hexano y diclorometano, no tuvieron actividad antimicrobiana contra la bacteria.

#### 4.5.1.9 Acinetobacter baumannii

Tabla 21. Agrupaciones por método de Tukey de la evaluación antimicrobiana de *A. baumannii* para *a. Montana*

Disolvente	N	Media	Agrupación			
Etanol	3	3.167	A			
Éter Etílico	3	2.000		B		
Control	3	2.000		B		
Acetone	3	2.000		B		
AcOEt	3	1.500			C	
Metanol	3	1.000				D
Agua	3	0.000000				E
Hexano	3	0.000000				E
DCM	3	0.000000				E

Comparando los resultados de *A. baumannii* enfrentándose a los extractos de *a. Montana* con los de *a. mexicana*, estos mostraron diferencias bastante significativas, de manera que la agrupación de las actividades antimicrobianas fueron diferentes entre sí estadísticamente hablando, como se muestra en la **tabla 21**. Sin embargo, los extractos de éter, acetona y el fármaco control, son estadísticamente iguales en cuanto a su actividad antimicrobiana. Por otra parte, las demás agrupaciones de extractos son significativamente diferentes dada la estadística del método, caso contrario a la evaluación realizada en los extractos de *a. mexicana*. En este caso, el extracto de etanol fue el que tuvo mayor actividad antimicrobiana en comparación al ensayo con *a. mexicana* que fue el extracto de éter, seguido del de etanol.

Los extractos de agua, hexano y diclorometano no han presentado ninguna actividad significativa como inhibidores del crecimiento bacteriano.

#### 4.5.1.10 *Pseudomonas aeruginosa*

*Tabla 22. Agrupaciones por método de Tukey de la evaluación antimicrobiana de P. aeruginosa para a. Montana*

Disolvente	N	Media	Agrupación			
Etanol	3	2.333	A			
Metanol	3	2.000	A	B		
Acetona	3	1.833		B	C	
AcOEt	3	1.500			C	
Control	3	1.000				D
Agua	3	0.000000				E
Hexano	3	0.000000				E
Éter Etfílico	3	0.000000				E
DCM	3	0.000000				E

Como último ensayo antimicrobiano, *P. aeruginosa* resultó sensible a los extractos de etanol, metanol, acetona, acetato de etilo y el fármaco control, en ese orden respectivamente, (**tabla 22**). El extracto de etanol fue el que tuvo mejores resultados, seguido con el de metanol, dónde este último es estadísticamente igual en actividad antimicrobiana que al de acetona y así mismo este último es igual al de acetato de etilo.

Un punto importante que destacar es que el fármaco control si tuvo actividad antimicrobiana para inhibir la proliferación bacteriana de *P. aeruginosa*, en comparación con las placas que se utilizaron

para el a. mexicana. Esto se puede justificar debido a que al haber sido de las últimas cepas que se sembró en las placas, ya no se encontraban refrigeradas y tienden a decantarse, la toma del inóculo de la cepa al momento de sembrar y estriar de manera masiva no fue lo suficiente en cuanto a concentración y por ello el fármaco control tuvo mayor actividad.

Extractos de éter, agua, hexano y diclorometano no tuvieron actividad antimicrobiana alguna, de los cuales, los 3 últimos no tuvieron ningún resultado positivo como inhibidores de la actividad bacteriana en ninguno de los ensayos realizados por triplicado en ambas árnica.

**Tabla 23. Medición de halos de inhibición de árnica Montana.**

Halos de inhibición árnica Montana											
Solvente	Concentración del extracto (g/mL)	Halo (mm)									
		Cepa 4	D.E.	Cepa 5	D.E.	Cepa 7	D.E.	Cepa 9	D.E.	Cepa 13	D.E.
Control	/	2.33	0.58	2.00	0.00	2.50	0.00	2.00	0.00	1.00	0.00
Hexano	13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Éter etílico	8.4	1.17	0.29	1.50	0.50	1.83	1.44	2.00	0.00	0.00	0.00
AcOEt	14.6	1.00	0.00	1.50	0.00	2.00	0.00	1.50	0.00	1.50	0.00
DCM	5.8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Acetona	7.5	1.50	0.00	1.00	0.00	2.00	0.00	2.00	0.00	1.83	0.29
Etanol	13.1	2.00	0.00	2.00	0.00	2.50	0.00	3.17	0.29	2.33	0.29
Metanol	24.7	1.50	0.00	1.50	0.00	2.17	0.29	1.00	0.00	2.00	0.00
Agua	/	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Dado los resultados de los extractos de árnica mexicana y Montana plasmados en las **tablas 17 y 23**, podemos decir que el extracto de etanol fue el que tuvo mejores resultados en todos los ensayos antimicrobianos en comparación con los demás extractos, los cuales son significativamente diferentes estadísticamente hablando de acuerdo al método de Tukey realizado, además, tres extractos en particular no tuvieron actividad antimicrobiana en ningún ensayo como lo son: hexano, diclorometano y agua, respectivamente, al igual que en los ensayos realizados en las cepas de árnica mexicana.

## 5. Conclusión

El árnica mexicana y el árnica Montana, tienen numerables beneficios para la salud, ya que ambas cuentan con metabolitos secundarios de gran relevancia y con beneficios terapéuticos como los terpenos, polifenoles como flavonoides o antocianinas y otros compuestos orgánicos como las lactonas o cumarinas presentes ya sea en los tallos, hojas, o flor de estas. Sin embargo, podemos concluir que los extractos de árnica mexicana son significativamente superiores a los de árnica Montana, ya que muy independientemente de que ambas plantas contengan metabolitos secundarios muy similares en concentración, la importancia radica en que tan solubles llegan a ser en disolventes para lograr obtener un extracto ideal, de manera que no sea tan tóxico, no sea demasiado caro y no afecte las propiedades fisiológicas del organismo.

El árnica mexicana es igual de potente que el árnica Montana en DPPH, pero en la captación de agentes oxidantes, para el árnica mexicana es mejor utilizar los extractos de etanol y para los de árnica Montana los de metanol, sin embargo se utilizarían principalmente los extractos de etanol en lugar de los de metanol, pues a pesar de que estadísticamente son igual de potentes y el metanol es ligeramente superior en cuanto a actividad, haciendo una comparativa, el metanol tiene más riesgos al utilizarse, pues puede dejar ciego a un individuo a bajas concentraciones, además de que es extremadamente tóxico, ya que, con tan solo mililitros consumidos, puede llegar a ser mortal para el humano a bajas concentraciones. Por otra parte, el extracto de etanol, es significativamente mejor que cualquiera de los demás extractos, ya que este disolvente, si bien si tiene cierta toxicidad, es de los más ideales, sino el que más lo es, ya que al ser un disolvente acuoso y orgánico, los metabolitos secundarios que llegan a ser más solubles en este y llegan a tener una mayor concentración de estos, son los flavonoides como las antocianinas, que, según la literatura, pueden llegar a ser moléculas antioxidantes y anticancerígenas y los terpenos, los cuales tienen propiedades antiinflamatorias, actividad antimicrobiana, antivirales y antitumorales. Es por ello por lo que los extractos de árnica mexicana tienen un plus en cuanto a la actividad antioxidante que presenta y, por ende, esta planta es mejor que la Montana.

Así mismo, la actividad antimicrobiana para ambas plantas fue un éxito, ya que al evaluar sus extractos frente a las principales bacterias que afectan a la piel, tales como *Acinetobacter baumannii*,

*Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, estas resultaron sensibles a extractos de etanol y metanol principalmente, además del ácido clavulánico-amoxicilina, el cual fue el fármaco de control utilizado. Un punto importante que destacar es la gran actividad antimicrobiana que posee el extracto de etanol tanto para árnica mexicana como árnica Montana, no solo por la cantidad de metabolitos secundarios que posee, sino también en la potencia que tiene para lograr inhibir la proliferación bacteriana de bacterias de gran importancia médica, especialmente la de *P. aeruginosa*, la cual es una bacteria multirresistente a diversos fármacos, inclusive a los betalactámicos, por lo que se piensa a futuro para utilizar este extracto antes mencionado para fines médicos y proponer un tratamiento más sofisticado en base a la cicatrización de heridas en la piel principalmente, evitando tratamientos más agresivos con combinación de fármacos que resultan ser muy caros y hacer una formulación farmacéutica de carácter tópico para prevenir el envejecimiento y deterioro de la piel de una manera más eficiente y más barata.

## 6. Referencias

- Acetona (Acetone)* | *ToxFAQ* | *ATSDR*. (2022, julio 19).  
[https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts21.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts21.html)
- Álvarez Castro, E., & Orallo Cambeiro, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm*, 22(10), 130–140.
- Amoxicilina: Antimicrobianos*. (s/f). McGraw Hill Medical. Recuperado el 9 de octubre de 2023, de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552&sectionid=90367280>
- Asfaw, A., Lulekal, E., Bekele, T., Debella, A., Abebe, A., & Degu, S. (2023). Documentation of traditional medicinal plants use in Ensaro District, Ethiopia: Implications for plant biodiversity and indigenous knowledge conservation. *Journal of Herbal Medicine*, 38, 100641. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100641>
- Aziz, M. A., Millat, M. S., Akter, T., Hossain, M. S., Islam, M. M., Mohsin, S., Ansari, F., Kabir, A., Amin, M. N., & Islam, M. S. (2023). A comprehensive review on clinically proven medicinal plants in the treatment of overweight and obesity, with mechanistic insights. *Heliyon*, 9(2), e13493. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13493>
- Barragán-Zarate, G. S., Lagunez-Rivera, L., Solano, R., Carranza-Álvarez, C., Hernández-Benavides, D. M., & Vilarem, G. (2022). Validation of the traditional medicinal use of a Mexican endemic orchid (*Prosthechea karwinskii*) through UPLC-ESI-qTOF-MS/MS characterization of its bioactive compounds. *Heliyon*, 8(7), e09867. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09867>

- Bueno-Sánchez, J. G., Martínez-Morales, J. R., & Stashenko, E. (2009). Actividad antimicrobacteriana de terpenos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 231–235.
- Canata, M. G., Navarro, R., Velázquez, G., Rivelli, S., Rodríguez, F., Céspedes, A., Espínola, C., Canese, J., & Guillén, R. (2016). Molecular characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolates obtained from feces of children with gastroenteritis at the Institute for Social Welfare Central Hospital in 2012. *Pediatría (Asunción)*, 43(1), 13–17. <https://doi.org/10.18004/ped.2016.abril.13-17>
- Carrera-Fernández, M. C., Herrera-Martínez, M., Ordaz-Hernández, A., & Arreaga-González, H. M. (2023). Medicinal plants from Mexico used in the treatment of scorpion sting. *Toxicon*, 230, 107172. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107172>
- García Martínez et al.pdf*. (s/f). Recuperado el 8 de octubre de 2023, de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>
- Gómez Álvarez, C. A., Leal Castro, A. L., Pérez de Gonzalez, M. de J., & Navarrete Jiménez, M. L. (2005). MECANISMOS DE RESISTENCIA EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA: ENTENDIENDO A UN PELIGROSO ENEMIGO. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(1), 27–34.
- Guía de Determinación de la actividad antioxidante.pdf*. (s/f). Recuperado el 8 de octubre de 2023, de <https://bonga.unisimon.edu.co/bitstream/handle/20.500.12442/7986/Gu%C3%ADa%20de%20Determinaci%C3%B3n%20de%20la%20actividad%20antioxidante.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Gutiérrez, S. L. G., Chilpa, R. R., & Jaime, H. B. (2014). Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(5), 591–608. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.007>
- Heras, I., Alvis, A., & Arrazola, G. (2013). Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (Solana melonera L.). *Información tecnológica*, 24(5), 93–102. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500011>
- Hiraki, Y., Yoshida, M., Masuda, Y., Inoue, D., Tsuji, Y., Kamimura, H., Karube, Y., Takaki, K., & Kawano, F. (2013). Successful treatment of skin and soft tissue infection due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by ampicillin–sulbactam and meropenem combination therapy. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(12), e1234–e1236. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.05.002>
- ICSC 0057—METANOL. (s/f). Recuperado el 7 de octubre de 2023, de [https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_version=2&p\\_card\\_id=0057&p\\_lang=es](https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_version=2&p_card_id=0057&p_lang=es)
- ICSC 0058—DICLOROMETANO. (s/f). Recuperado el 7 de octubre de 2023, de [https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_card\\_id=58&p\\_version=1&p\\_lang=es](https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=58&p_version=1&p_lang=es)
- Infecciones por enterococos—Enfermedades infecciosas*. (s/f). Manual MSD versión para profesionales. Recuperado el 9 de octubre de 2023, de <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-enterococos>
- López Luengo, M. T. (2002). Flavonoides. *Offarm*, 21(4), 108–113.
- Metabolitos secundarios, indicadores de calidad y características organolépticas de la harina de tallos de Agave fourcroydes (Henequén)*. (s/f). Recuperado el 8 de octubre de 2023, de

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2079-](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-)

[34802020000100025&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802020000100025&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Mssillou, I., Bakour, M., Slighoua, M., Laaroussi, H., Saghrouchni, H., Ez-Zahra Amrati, F., Lyoussi, B., & Derwich, E. (2022). Investigation on wound healing effect of Mediterranean medicinal plants and some related phenolic compounds: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 298, 115663. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115663>

Rodríguez-Chávez, J. L., Egas, V., Linares, E., Bye, R., Hernández, T., Espinosa-García, F. J., & Delgado, G. (2017). Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 195, 39–63. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.021>

Sader, H. S., Castanheira, M., Duncan, L. R., & Mendes, R. E. (2021). Antimicrobial activities of ceftazidime/avibactam, ceftolozane/tazobactam, imipenem/relebactam, meropenem/vaborbactam, and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* from patients with skin and soft tissue infections. *International Journal of Infectious Diseases*, 113, 279–281. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.10.022>

Sharma, A., Gupta, S., Sarethy, I. P., Dang, S., & Gabrani, R. (2012). Green tea extract: Possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. *Food Chemistry*, 135(2), 672–675. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.143>

Shiffman, M. A. (2012). Arnica montana. En P. M. Prendergast & M. A. Shiffman (Eds.), *Aesthetic Medicine* (pp. 289–294). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-20113-4\\_28](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20113-4_28)

Singh, P., Montano, A., & Bostick, A. (2021). Rapid severe sepsis from *Pseudomonas fluorescens/putida* bacteremia due to skin and soft tissue infection – A case report. *Annals of Medicine and Surgery*, 70, 102845. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102845>

Xu, D. (2023). Babesiosis concurrent with multiple abscesses from *Staphylococcus aureus* infection: A case report. *Heliyon*, 9(8), e18563. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18563>